Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

UNTERSUCHUNGEN ZUR STANDARDISIERUNG DER „PIPETTENMETHODE", EINER NEUEN, ZEITSPARENDEN METHODE ZUR CHROMOSOMENPRÄPARATION IN DER PRÄNATALDIAGNOSTIK

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Klaus Hermann

1981

UNIV.
LEIDEN

UNTERSUCHUNGEN ZUR STANDARDISIERUNG DER "PIPETTENMETHODE", EINER NEUEN, ZEITSPARENDEN METHODE IN DER PRÄNATALDIAGNOSTIK

vorgelegt von

KLAUS HERMANN

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0049

MEINEN ELTERN

GEWIDMET

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.:
Priv. Doz. Dr. Claussen

Korreferent
gez.:
Priv. Doz. Dr. Terinde

G L I E D E R U N G

Seite

1. E I N L E I T U N G 3

2. P R O B L E M S T E L L U N G 4

2.1. Methoden der Chromosomenpräparation 4

2.1.1. Geschichtlicher Oberblick 4
2.1.2. Die " in - situ " Technik 5
2.1.3. Die " Trypsinierungstechnik " 6
2.1.4. Die " Pipettenmethode " 6

2.2. Problematik der einzelnen Techniken unter besonderer Berücksichtigung der " Pipettenmethode " 9

3. E I G E N E V E R S U C H E 13

4. M A T E R I A L U N D M E T H O D E 15

4.1. Ausgangsmaterial 15

4.2. Versuchsbeschreibungen 15

4.2.1. Morphologische Veränderungen von Klonen nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung 15

4.2.2. Auswertbarkeit der Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien 16

4.2.3. Aufarbeitung mit der " Pipetten - methode " unter gezielter Entnahme der Mitosen; Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " 18

4.2.4. Aufarbeitung mit der " Pipetten - methode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid 21

4.2.4.1. Aufarbeitung ohne Colcemid . 21

4.2.4.2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock 22

4.2.4.3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur 22

5. E R G E B N I S S E 23

5.1. Morphologische Veränderungen von Klonen nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung 23

5.2. Auswertbarkeit von Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien 30

5.3. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " unter gezielter Entnahme der Mitosen; Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " 44

5.4. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid 47

5.4.1. Aufarbeitung ohne Colcemid 47

5.4.2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock 54

5.4.3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur 59

Seite

6. D I S K U S S I O N 62

6.1. Morphologische Veränderungen von Klonen nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung 62

6.2. Auswertbarkeit der Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien 63

6.3. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " unter gezielter Entnahme der Mitosen; Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " 66

6.4. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid 66

6.4.1. Aufarbeitung ohne Colcemid 66

6.4.2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock 67

6.4.3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur 68

6.5. Kritische Bewertung der " Pipettenmethode ".. 69

7. Z U S A M M E N F A S S U N G 71

8. L I T E R A T U R 74

1. E I N L E I T U N G

Die pränatale Chromosomendiagnostik erfordert die Kultivierung fetaler Zellen aus dem Fruchtwasser, das mittels Amniozentese meist in der 16. Schwangerschaftswoche gewonnen wird.

Zur Kultivierung und Aufarbeitung des Zellmaterials stehen zur Zeit zwei international gebräuchliche Methoden zur Verfügung:

1. Die " in - situ " Technik
2. Die " Trypsinierungstechnik "

Die Zeit zwischen Amniozentese und Diagnosestellung aus den aufgearbeiteten Fruchtwasserkulturen beträgt bei einem Vergleich zahlreicher europäischer Laboratorien für die " in - situ " Technik 13.4 Tage und für die " Trypsinierungstechnik " 15.7 Tage (THERKELSEN, 1979).

Im Interesse einer schnelleren Diagnostik entwickelte CLAUSSEN (1980) eine neue, zeitsparende Methode zur Chromosomenpräparation, die " Pipettenmethode ".

Die vorliegende Arbeit umfaßt Versuchsreihen zur Standardisierung dieser " Pipettenmethode ".

UNIV. LEIDEN

2. P R O B L E M S T E L L U N G

2.1. Methoden der Chromosomenpräparation

2.1.1. Geschichtlicher Oberblick

FUCHS (196o) schlug als erster vor, durch Kultivierung fetaler Amnionzellen und Präparation der Chromosomen die pränatale Diagnostik chromosomaler Anomalien zu ermöglichen.

STEELE und BREG (1966) zeigten durch Anwendung der Trypan - Blau Vitalfärbung, die von MERCHANT et al. (196o) entwickelt wurde, die Lebensfähigkeit der Amnionzellen. Die erfolgreiche Kultivierung und Karyotyp - isierung der fetalen Zellen gelang allerdings nur in zwei von zwölf Fällen und nach einer Kulturzeit von fünf Wochen. Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte nach der " Trypsin - ierungstechnik ". Der Einsatz verschiedener Nährmedien hatte gezeigt, daß ihre Kulturen am besten in Gegenwart von fetalem Kälberserum (12%) wuchsen.

JACOBSON und BARTER (1967) erreichten die erfolgreiche Kultivierung der fetalen Amnion - zellen in 62 von 92 Fällen durch Erhöhung des Anteils an fetalem Kälberserum auf 3o%, Mediumwechsel in kürzeren Intervallen, Silikonisierung der Glasgefäße und Präparation der Chromosomen " in - situ ".

VALENTI und KEHATY (1968) konnten in 17 von 24 Fällen eine erfolgreiche Chromo - somenpräparation durchführen und erreichten eine durchschnittliche Kulturzeit von 26.6 Tagen. Zur Aufarbeitung verwendeten sie die " Trypsinierungstechnik ".

NADLER (1968) definierte die erfolgreiche Kultivierung der Fruchtwasserzellen als Fähigkeit, ausreichendes Wachstum auch nach zweimaliger Subkultivierung zu erhalten.

Dies gelang ihm bei 27 von 37 angelegten Kulturen.
Durch weitere Standarisierungen und Verbesserungen der Kulturbedingungen (Art und Zusammensetzung der Nährmedien, CO_2 - Anteil, Rhythmus des Mediumwechsels usw.) und der Aufarbeitungstechniken (" in - situ " Technik, SCHMID, 1975, und " Trypsinierungstechnik " KNORR - GARTNER und HARLE, 1972) konnte die Kulturzeit in den folgenden Jahren erheblich gesenkt werden.
In einer schon erwähnten vergleichenden Studie europäischer Laboratorien ermittelte THERKELSEN (1979) für die " in - situ " Technik eine durch - schnittliche Kulturzeit von 13.4 Tagen und für die " Trypsinierungstechnik " von 15.7 Tagen.
Die von CLAUSSEN (198o) entwickelte " Pipetten - methode " verspricht eine weitere entscheidende Senkung der Kulturzeit.
Die vorliegende Arbeit enthält Untersuchungen zur Standardisierung der " Pipettenmethode " und zeigt deren Zeitersparnis auf.

2.1.2. Die " in - situ " Technik

Die Kultivierung fetaler Zellen erfolgt auf Deckgläschen. Als Kulturgefäße stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, z.B. Leighton - Tubes, Kulturflaschen oder Petri - Schalen. Das Zellmaterial wird nach ausreichendem Wachstum " in - situ ", d.h. ohne Zustandsveränderung des klonalen Wachstums, aufgearbeitet. Zunächst läßt man Colcemid - Lösung (o.3 ug / ml) für zwei bis fünf Stunden auf die Kultur einwirken. Colcemid ist ein Alkaloid der Herbstzeitlosen, das die Ausbildung des Spindel - apparates während der Zellteilung verhindert und die Mitosen in der Metaphase arretiert. Nach Ent - fernen des Mediums mit dem Colcemid erfolgen die hypotone Behandlung (z.B. mit KCl - Lösung, o.o75%) und die Fixation (z.B. mit einem Methanol - Eisessig Gemisch im Verhältnis 3:1). Danach werden die Deck - gläschen aus dem Kulturgefäß geholt und auf Objekt -

träger gelegt. Nach der Färbung werden die Präparate mikroskopiert.
(s. Abbildung 1)

2.1.3. Die " Trypsinierungstechnik "

Bei dieser Technik läßt man die Fruchtwasserzellen direkt auf dem Boden eines Kulturgefäßes, meist Kulturflaschen oder Petri - Schalen, wachsen. Sobald das Wachstum ausreichend ist, wird Colcemid - Lösung (o.3 µg / ml) für zwei bis fünf Stunden zur Kultur gegeben. Danach wird das Zellmaterial enzymatisch (z.B. mit Trypsin - EDTA) vom Boden abgelöst. Die weitere Aufarbeitung der Zellsuspension mit Hypotonie und Fixation (s. 2.1.2.) erfolgt im Reagenzglas.
Anschließend wird das Zellmaterial auf Objektträger aufgetropft, gefärbt, eingedeckt und mikroskopiert.
(s. Abbildung 2)

2.1.4. Die " Pipettenmethode "

Die Kultivierung der fetalen Zellen erfolgt in Petri - Schalen. Die Aufarbeitung kann beginnen, sobald die ersten Mitosen in der Kultur erscheinen. Zunächst läßt man Colcemid - Lösung (o.3 ug / ml) für zwei bis fünf Stunden auf die Kultur einwirken (vgl. 2.1.2.). Anschließend wird unter Sicht eine (oder mehrere) Mitose(n) mit einer Mikropipette mit Hilfe eines Mikromanipulators aufgesogen und in eine Petri - Schale mit hypotoner Lösung überführt. Nach Wiederaufnahme der Mitose erfolgt die Fixation in der Pipette. Anschließend wird die Mitose auf einen Objektträger aufgetropft, gefärbt, eingedeckt und mikroskopiert.
(s. Abbildung 3)

Abbildungen 1 - 3 : Methoden der Chromosomenpräparation

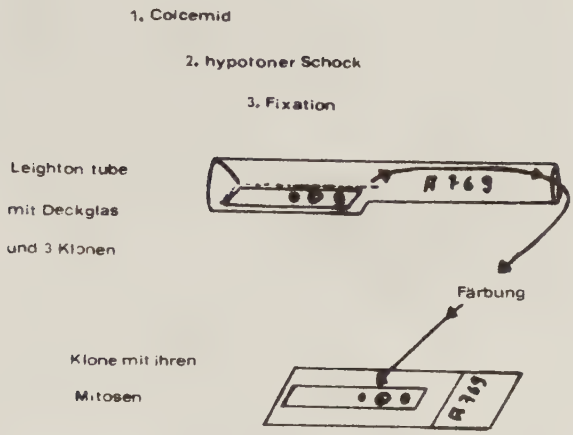


Abb. 1 : Die " in - situ " Technik

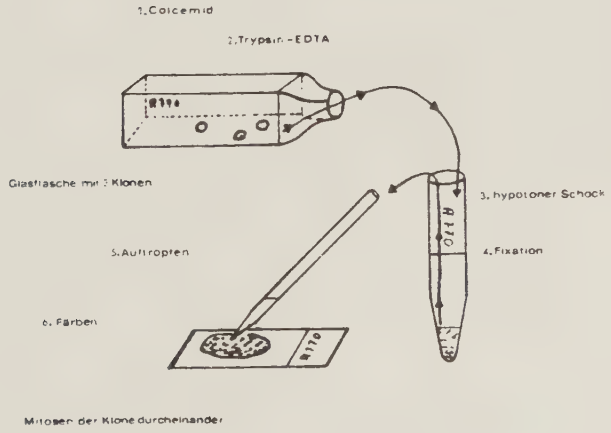


Abb. 2 : Die " Trypsinierungstechnik "

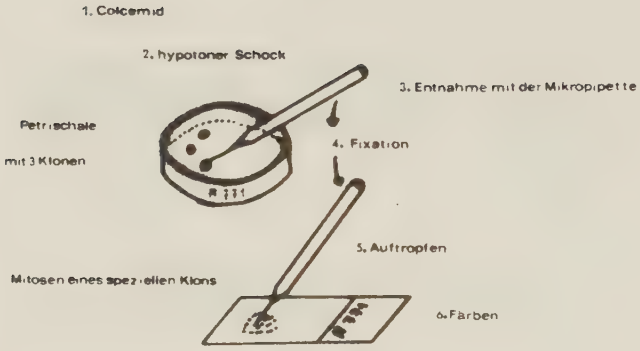


Abb. 3 : Die " Pipettenmethode "

2.2. Problematik der einzelnen Techniken unter besonderer Berücksichtigung der " Pipettenmethode "

Aus der Beschreibung der Methoden für die Chromosomenpräparation können deren Vor - und Nachteile gegeneinander abgegrenzt werden:

Die " in - situ " Technik

Vorteil: Die Mitosen können morphologisch definierten Klonen zugeordnet werden. Im Klon entstandene Mutationen können dadurch als kulturbedingt erkannt (SCHMID, 1975 und 1977) und von pathologischen Chromosomenkonstellationen des Feten leichter abgegrenzt werden.

Nachteile: 1. Die " G - banding " Technik ist wegen der hohen Zelldichte in Primärkulturen normalerweise nicht anwendbar. Nach Sub - kultivierung ist dies jedoch möglich (SCHMID, 1975). Dadurch entfällt allerdings der Vorteil der Zuordnung der Mitosen zu ihrem Klon.

2. Die Anwendung der "in - situ " Technik setzt den Abbruch bzw. die Fixation der Kultur in einem Kulturgefäß voraus. Die abgetöteten fetalen Zellen stehen für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung.

Die " Trypsinierungstechnik "

Vorteile: 1. Die Aufarbeitung mit der " Trypsin - ierungstechnik " ist im Vergleich mit der " in - situ " Technik weniger aufwendig.

2. Im Gegensatz zur " in - situ " Technik ist die Anwendung der " G - banding " Technik und anderer banding - Verfahren bei der " Trypsinierungstechnik " sehr gut möglich.

Nachteile: 1. Die Rate numerischer und struktureller Chromosomenanomalien ist bei der " Trypsin - ierungstechnik " höher als bei der " in - situ " Technik (HOEHN, 1975).

2. Die Zuordnung von Mitosen zu morphologisch definierten Klonen ist nicht mehr möglich.

3. Die durchschnittliche Kulturzeit ist bei der " Trypsinierungstechnik " länger als bei der " in - situ " Technik (THERKELSEN, 1979 und. HOEHN, 1974).
4. Durch die enzymatische Ablösung des Zellmaterials vom Boden des Kulturgefäßes stehen die fetalen Zellen für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung.

Die " Pipettenmethode " bietet demgegenüber vor allem folgende Vorteile:

1. Die Aufarbeitung kann beginnen, sobald die ersten Mitosen in der Kultur erscheinen.
2. Bei der Aufarbeitung geht praktisch kein Zell - material verloren, da gezielt lediglich die Mitosen entnommen werden.
3. Nach sofortigem Mediumwechsel im Anschluß an die Aufarbeitung geht das Wachstum der Kultur in der Regel ungestört weiter.
4. Die Entscheidung zur Aufarbeitung kann wegen der geringen technischen Voraussetzungen jederzeit getroffen werden.
5. Die Zuordnung der Mitosen zu morphologisch definierten Klonen ist wie bei der " in - situ " Technik möglich.
6. Die Anwendung der " G - banding " Technik ist inzwischen erfolgreich durchgeführt worden. Die Qualität der Metaphasen entspricht derjenigen bei der " Trypsinierungstechnik " , da die Zellen eben - falls auf Objektträger aufgetropft werden. (s. Abb. 4

Andererseits ist die " Pipettenmethode " noch mit einigen Schwierigkeiten behaftet, die in der vorliegenden Arbeit einer Lösung näher gebracht werden sollen:

1. Mitosen, die unter dem Invertoskop rund und glasig erscheinen, befinden sich nicht immer im Stadium der Metaphase und eignen sich daher häufig nicht für die Chromosomenanalyse.

2. Die aufgetropften Metaphaseplatten sind nicht immer auswertbar.

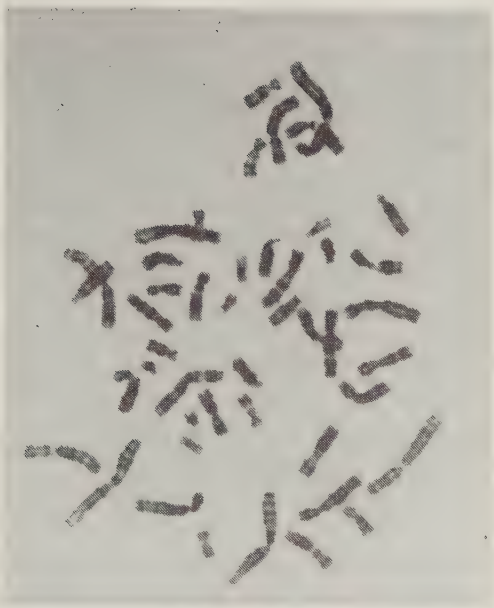


Abb. 4 : Metaphaseplatte nach Aufarbeitung
mit der "Pipettenmethode ";
Anwendung der G - banding Technik
männlicher Karyotyp : 46, XY

Die Problematik bei der Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " besteht in der Auswahl derjenigen Mitosen, die sich im Stadium der Metaphase befinden. Nur sie eignen sich in der Regel für die Chromosomen - analyse.
Durch Beobachtungen der Vorgänge bei Zellteilungen ist erkennbar, daß Zellen sich im Laufe einer Mitose abrunden und im Stadium der Metaphase eine Kugelform erreichen. In der mikroskopischen Aufsicht erscheinen sie meist als rund. Bei der Weiterentwicklung zur Anaphase weichen die beiden Tochterzellen auseinander; die Mitosen sehen dann hantelförmig aus. Es gibt folglich Zusammenhänge zwischen der Morphologie und dem Teilungsstadium der Mitosen.

Das Zellmaterial eines Kulturgefäßes wird bei der Aufarbeitung mit der " in - situ " Technik und mit der " Trypsinierungstechnik " durch die Fixation zerstört und steht für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung. Ziel der Aufarbeitung bei Verwendung dieser beiden Verfahren muß es demnach sein, eine möglichst hohe Ausbeute an Metaphasen bei der Chromosomenanalyse zu erreichen. Der Einsatz von Colcemid zur Arretierung der Mitosen im Stadium der Metaphase ist demnach sinnvoll.

Die " Pipettenmethode " hingegen ermöglicht die Entnahme einzelner Mitosen aus einem Klon ohne Beeinflussung des übrigen Kulturwachstums. Der für die Kultur wachstums - hemmende Einfluß von Colcemid scheint daher nicht gerecht - fertigt zu sein. Der Verzicht auf Colcemid würde eine Erleichterung bei der Aufarbeitung und eine Schonung des Kulturwachstums bedeuten. Es ist allerdings möglich, daß sich die Mitosen bei diesem Vorgehen im Verlauf der Aufarbeitung weiterentwickeln und für die Chromosomen - analyse nicht verwertbar sind.
Zur Bearbeitung dieser Problematiken wurden gezielte Untersuchungen vorgenommen.

3. E I G E N E V E R S U C H E

Zur Aufarbeitung klonal gewachsener Zellen für die Chromosomenanalyse ist es üblich, das Zellwachstum in der Metaphase zu arretieren und die Klone einer hypotonen Lösung auszusetzen. Die Auswirkungen dieser Maßnahmen auf die Morphologie von fetalen Klonen verschiedener Größe sollten überprüft und dokumentiert werden.

Die Chromosomenpräparation mit der " Pipettenmthode " setzt die Entnahme von Mitosen aus einem Klon voraus. Wachsende und sich teilende Zellen verändern ihr Aussehen in Abhängigkeit vom Mitosestadium (s. 2.2.). Es wurden deshalb zunächst morphologische Kriterien von Mitosen definiert. In einer ersten Untersuchung sollte geprüft werden, welche dieser Kriterien bezüglich der Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse weiter zu verwerten seien. Die Entnahme der Mitosen erfolgte deshalb weitgehend ohne Berücksichtigung ihrer Morphologie.

In einer weiteren Untersuchung wurden dann anhand der vorher erarbeiteten Kriterien diejenigen Mitosen gezielt aufgearbeitet, von denen angenommen wurde, daß sie sich im Stadium der Metaphase befänden. Es sollte gezeigt werden, daß durch diese gezielte Entnahme der Mitosen die Ausbeute an Metaphasen resp. deren Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse erhöht werden kann. Außerdem sollte die Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipetten - methode " aufgezeigt werden. Es wurden deshalb nur Mitosen aus Klonen aufgearbeitet, die bis zu acht Tagen alt waren.

Die bisher gebräuchlichen Methoden der Chromosomen - präparation (s. 2.1.2. und 2.1.3.) erfordern sinnvoll die Verwendung von Colcemid bei der Aufarbeitung. Da beim Einsatz der " Pipettenmethode " lediglich einzelne Mitosen entnommen werden ohne das übrige Kulturwachstum zu beein - flussen, scheint die Verwendung von Colcemid bei der Aufarbeitung nicht erforderlich zu sein.

Der Verzicht auf den Einsatz von Colcemid würde eine Erleichterung der Aufarbeitung und eine Schonung der Kultur bedeuten.
Es sollte deshalb geprüft werden,ob sich die Mitosen ohne Colcemid - Einwirkung im Verlauf der Aufarbeitung weiter - entwickeln und sich demnach bei der Chromosomenanalyse überhaupt Mitosen im Stadium der Metaphase befänden. Dies ist aber eine wichtige Vorbedingung für die Anwendbarkeit einer Aufarbeitungstechnik zur Chromosomenpräparation.
Der Einsatz von Colcemid zur Arretierung der Mitosen im Stadium der Metaphase erfolgte deshalb in zwei weiteren Untersuchungen: zunächst wurde Colcemid zum hypotonen Schock gegeben. Dadurch wurde vermieden, den Klon der wachstumshemmenden Colcemid - Wirkung auszusetzen. In einer letzten Untersuchung erfolgte die Gabe von Colcemid direkt zur Kultur, wie es dem üblichen Vorgehen bei der Auf - arbeitung von Fruchtwasserkulturen entspricht.

Die oben beschriebenen Untersuchungen wurden unter den folgenden Überschriften ausgeführt:

1. Morphologische Veränderungen von Klonen verschiedener Größe nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung
2. Auswertbarkeit von Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien
3. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " unter gezielter Entnahme von Mitosen; Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode "
4. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid
   a. Aufarbeitung ohne Colcemid
   b. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock
   c. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur

4. M A T E R I A L U N D M E T H O D E

4.1. Ausgangsmaterial

Die Mitosen für die Versuche entstammten von Kulturen fetaler Fruchtwasserzellen, die nach folgendem üblichen Laborverfahren angelegt wurden:
Die Züchtung der fetalen Zellen erfolgte in Petri - Schalen.
Mediumzusammensetzung:
Ham`s F 1o (Fa. Flow) mit 25% fetalem Kälber - serum (Fa. Seromed) und Penicillin - Strepto - mycin, insgesamt 5 ml;
Kultivierung in Brutschränken mit ca. 4 Vol% CO_2 und 85 - 95% relativer Luftfeuchtigkeit bei 37^{o} C.

Bei der Aufarbeitung erfolgte keine ausdrückliche Unterscheidung der verschiedenen Klontypen, deren relative Häufigkeit in Fruchtwasserkulturen HOEHN (1974) beschrieben hat (AF - Klone: 66.5%, E - Klone: 24.7% und F - Klone: 8.8%).

4.2. Versuchsbeschreibungen

Vorbemerkung:

Die Erstellung morphologischer Kriterien von Klonen und Mitosen erfolgte unter dem Invertoskop (Fa. Leitz, Gesamtvergrößerung 63 x).

4.2.1. Morphologische Veränderungen von Klonen verschiedener Größe nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung

Ziel dieser Untersuchungen war, morpho - logische Veränderungen des klonalen Wachs - tums nach Zugabe von Colcemid - Lösung (o.3 µg / ml, Fa. Seromed) und hypotoner Lösung (aqua dest., 37^{o} C) zur Kultur festzustellen und zu dokumentieren. Diese Beobachtungen dienten als Grundlage für die späteren Versuchsreihen zur Morphologie der Mitosen (s. 4.2.2.).

Das Alter der Kulturen wurde nicht berücksichtigt.

Zur Dokumentation der Veränderungen wurde bezüglich der Klongröße die folgende Einteilung getroffen:

a. beginnendes Wachstum
einzeln liegende Zellen, ohne erkennbaren Kontakt untereinander
b. mittleres Wachstum
zunehmend dichterer Zellverband; die Klongröße entspricht etwa einem Gesichtsfeld im Invertoskop
c. großer Klon
dichter Zellrasen über mehr als ein Gesichtsfeld; Mitosen meist randständig

Die Fotodokumentation der Veränderungen dieser Klone nach Zugabe von Colcemid und hypotoner Lösung erfolgte nach folgendem Schema:

a. Klon in situ, unbehandelt
b. Klon ca. 4 Stunden nach Zugabe von Colcemid, bzw. unmittelbar vor Zugabe der hypotonen Lösung
c. Klon ca. 2o Minuten nach Zugabe der hypotonen Lösung
d. Klon ca. 4o Minuten nach Zugabe der hypotonen Lösung

4.2.2. Auswertbarkeit der Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien

Diese Untersuchung überprüft, ob anhand der Morphologie das Teilungsstadium einer Mitose erkannt werden kann. Dazu mußten zunächst die nachfolgend beschriebenen morphologischen Kriterien von Mitosen definiert werden.
Die Entnahme der Mitosen bei der Durchführung der Versuche erfolgte zufällig, also weder gezielt nach zeitlichen noch nach morphologischen Gesichts - punkten des klonalen Wachstums.

Morphologische Kriterien:

a. Wachstumsstadium des Klons (s. 4.2.1.)

b. Lage der Mitose im Klon

Die Lage einer Mitose im Klon wurde entweder als randständig oder als zentral gelegen definiert.

c. Größe der Mitose

Es wurde eine willkürliche Klassifizierung in kleine, mittelgroße und große Mitosen vorgenommen. Durch Ausmessung der Mitosen in der Kultur wurde versucht, ihre Größe zu objektivieren. Dabei ergab sich näherungsweise die folgende Größeneinteilung:

kleine Mitosen	- bis etwa 15 µm Durchmesser
mittelgroße Mitosen	- etwa 15 - 25 µm Durchmesser
große Mitosen	- größer als 25 µm im Durchmesser

d. Form der Mitose

Die Form einer Mitose wurde als rund oder als entrundet definiert.

e. Randschärfe der Mitose

Zellen runden sich im Laufe einer Mitose zunehmend ab und bilden eine Kugelform aus; in der mikroskopischen Aufsicht erscheinen sie deshalb rund und mit scharf konturiertem Rand. Daneben wurden Mitosen beobachtet, die sich nur schwer scharf einstellen ließen. Es erfolgte deshalb zunächst eine Einteilung in Mitosen mit scharfem und unscharfem Rand.

f. Ablösbarkeit der Mitose vom Boden

Bestimmte Mitosen ließen sich nur schwer und oft gar nicht vom Boden des Kulturgefäßes ablösen; bei ihnen konnten in vielen Fällen " füßchenartige " Ausziehungen der Zellmembran festgestellt werden.
Mitosen mit glattem Rand hingegen konnten in der Regel meist leicht abgelöst werden.

g. Morphologische Veränderungen im hypotonen Schock

Im Laufe der ca. 15 Minuten, während der hypotone Schock auf die Mitosen einwirkte, konnten an ihnen vielfältige morphologische Veränderungen festgestellt werden. Diese Veränderungen wurden wie folgt definiert:

Größenzunahme im hypotonen Schock
Größenabnahme im hypotonen Schock
Weiterentwicklung im hypotonen Schock
Verlust der Membranstabilität

4.2.3. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " unter gezielter Entnahme der Mitosen;
Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode "

Ablauf der Aufarbeitung:

Der Einsatz der " Pipettenmethode " zur Chromosomen - präparation setzt die Entnahme von Mitosen aus einem Klon voraus. Die Kultivierung der fetalen Zellen erfolgt in Petri - Schalen mit üblichem Medium (s. 4.1.).
Die Aufarbeitung kann beginnen, sobald die ersten Mitosen in der Kultur erscheinen. Mediumwechsel ca. 24 Stunden vor Beginn der Versuche synchronisiert das Zellwachstum und erhöht die Mitoserate im Klon.
Zur Aufarbeitung läßt man Colcemid - Lösung (o.3. µg / ml, Fa. Seromed, 37° C) für zwei bis fünf Stunden auf die Kultur einwirken. Anschließend werden unter Sicht (Invertoskop, Fa. Leitz, Gesamtvergrößerung x 63) mit einer Mikropipette (ausgezogene Pasteur - Pipette, Innendurchmesser 2o - 6o µm) und mit Hilfe eines Mikromanipulators (Prior, England) eine oder mehrere Mitosen entnommen und in eine Petri - Schale mit hypotoner Lösung überführt (KCl - Lösung, o.o75%, 37°C).
Mikropipette und Petri - Schale sind silikonisiert (Silikon - Lösung, Fa. Serva, 1%), um ein Festhaften der Mitosen an der Innenwand der Pipette bzw. auf dem Boden der Petri - Schale zu verhindern. Die Aspiration der Mitosen erfolgt mit einem Verbindungsschlauch und

mit einem Mundstück durch Sog (s. Abb. 6 und 7). Nach ca. 15 Minuten im hypotonen Schock nimmt man die Mitose(n) mit möglichst wenig hypotoner Lösung wieder in die Pipette auf. Die Fixation erfolgt durch Aufsaugen von eisgekühltem Fixativ (Methanol - Eisessig Gemisch im Verhältnis 3:1, frisch angesetzt) in der Pipette. Sofort danach wird die Mitose auf einen Objektträger aufgetropft, gefärbt, eingedeckt und mikroskopiert.

Die Abbildung 5 zeigt die Apparate, die beim Einsatz der " Pipettenmethode " benötigt werden.

Abb. 5 : Apparate, die beim Einsatz der " Pipettenmethode " benötigt werden:

1. Arbeitsbank
2. Invertoskop
3. Petri - Schale
4. Mikropipette
5. Verbindungsschlauch zum Ansaugen der Mitosen
6. Mikromanipulator

Abbildungen 6 und 7 : Ablauf der Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode "; Mitose vor und in der Mikropipette

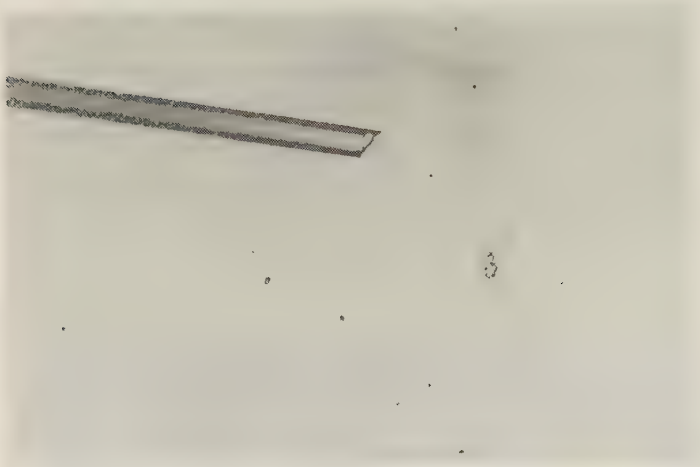


Abb. 6 : Mikropipette; Mitose in einer Kultur, vor der Entnahme

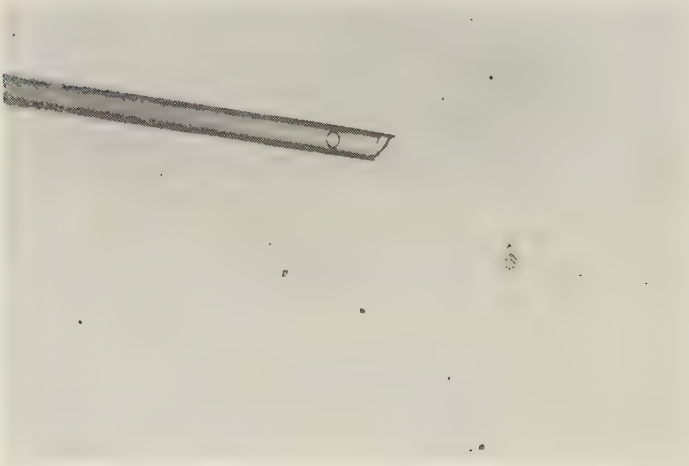


Abb. 7 : dieselbe Mitose in der Mikropipette , nach dem Aufsaugen

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden morphologische Kriterien von Mitosen erarbeitet und auf ihre Verwertbarkeit bei der Chromosomen - analyse überprüft.

Zur Erhöhung der Ausbeute an Metaphasen, von der im wesentlichen die Auswertbarkeit bei der Chromo - somenanalyse abhängt, wurden nun gezielt diejenigen Mitose für die Aufarbeitung herangezogen, die man auf Grund ihrer Morphologie dem Stadium der Metaphase zuordnen konnte.
Die Aufarbeitung erfolgte nach Gabe von Colcemid zur Kultur (s. 4.2.4.3.).

Die Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " sollte dokumentiert werden. Es wurden deshalb Mitosen nur aus Kulturen berücksichtigt, die bis zu acht Tagen alt waren.

2.4. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid

Ablauf der Aufarbeitung (s. 4.2.3.)

Die Notwendigkeit der Verwendung von Colcemid beim Einsatz der " Pipettenmethode " zur Chromosomen - präparation sollte in den folgenden Untersuchungen geprüft werden:

4.2.4.1. Aufarbeitung ohne Colcemid

Die Mitosen wurden ohne vorherige Gabe von Colcemid, d.h. ohne Arretierung in der Metaphase aus der Kultur entnommen und aufgearbeitet. Durch diesen Versuchsansatz wurde vermieden, die Kultur der wachstums - hemmenden Wirkung von Colcemid auszusetzen. Es sollte geprüft werden, ob sich die Mitosen im Verlauf der Aufarbeitung weiter entwickeln, und ob sich bei der Chromosomenanalyse über - haupt Mitosen im Stadium der Metaphase befinden.

4.2.4.2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock

Das Wachstum des Klons blieb auch bei diesem Versuchsansatz von der Colcemid - Wirkung unbeeinflußt. Die entnommenen Mitosen sollten jedoch in der Metaphase arretiert werden. Deshalb wurde Colcemid zum hypotonen Schock gegeben, in welchem die Mitosen nach der Entnahme aus der Kultur für ca. 15 Minuten blieben.

4.2.4.3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur

Bei diesem Versuchsansatz wurde - entsprechend den üblichen Techniken der Chromosomenpräparation - Colcemid für zwei bis fünf Stunden direkt zur Kultur gegeben.

5. E R G E B N I S S E

5.1. Morphologische Veränderungen von Klonen nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung

Zur Aufarbeitung klonal gewachsener Zellen für die Chromosomenanalyse sind die Verwendung von Colcemid zur Arretierung der Mitosen in der Meta - phase und von hypotoner Lösung zur Quellung der Mitosen üblich (s. 2.1.2. und 2.1.3.).
Die Auswirkungen dieser Maßnahmen auf die Morpho - logie fetaler Klone sind in den Abbildungen 8 - 1o zusammengefaßt.
Die Abbildungen 8 a - d zeigen beginnendes Wachstum in - situ (8a), vier Stunden nach Gabe von Colcemid zum Klon (8b), 2o Minuten (8c) und 4o Minuten (8d) nach Gabe von hypotoner Lösung zum Klon.

Die Gabe von Colcemid bewirkt Veränderungen in der Morphologie der Zellen:
Strukturen im Zellkern und im Zytoplasma sind im Vergleich zur Aufnahme in - situ deutlicher erkenn - bar, teilweise bilden sich Vakuolen.
Die Zellen insgesamt scheinen geschrumpft zu sein, die Zellränder sind scharf konturiert.

Nach Gabe von hypotoner Lösung ist eine Vergrößerung der Zellen durch Quellung zu beobachten, die nach 4o Minuten besonders ausgeprägt ist. Die Strukturen im Zellkern und im Zytoplasma wirken im Vergleich zur Aufnahme nach Gabe von Colcemid wieder ver - schwommener, die Randkonturen der Zellen nehmen an Schärfe ab.

Abbildungen 8 a - d : beginnendes Wachstum

Abb. 8 a : beginnendes Wachstum, in - situ

Abb. 8 b : beginnendes Wachstum, 4 Std. nach Gabe von Colcemid
(GZ: geschrumpfte Zelle; V: Vakuolen)

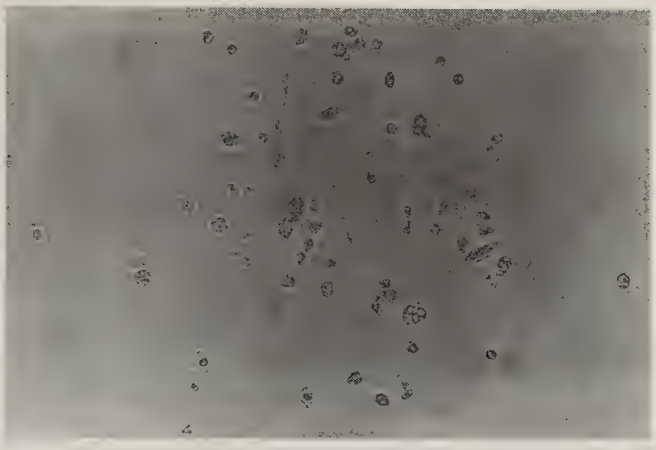


Abb. 8 c : beginnendes Wachstum,
2o min. nach Gabe von hypotoner Lösung
(Q: beginnende Quellung der Zellen)

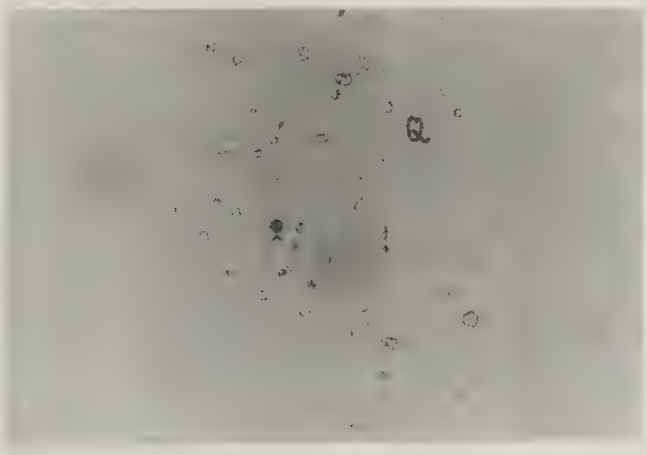


Abb. 8 d : beginnendes Wachstum,
4o min. nach Gabe von hypotoner Lösung
(Q: deutliche Quellung der Zellen)

Die morphologischen Veränderungen mittelgroßer (Abb. 9 a - d) und großer Klone (Abb. 1o a - d) waren ähnlich denen bei beginnendem Wachstum. Der spezifische Effekt von Colcemid war an einer deutlichen Zunahme runder Mitosen (= Metaphase, vgl. 2.2) zu erkennen (Abb. 9 und 10, b - d).

Abbildungen 9 a - d : mittleres Klonwachstum

Abb. 9 a : mittleres Klonwachstum, in - situ

Abb. 9 b : mittleres Klonwachstum,
4 Std. nach Gabe von Colcemid

Abb. 9 c : mittleres Klonwachstum,
2o min. nach Gabe von hypotoner Lösung
- deutliche Zunahme der Anzahl der Mitosen -

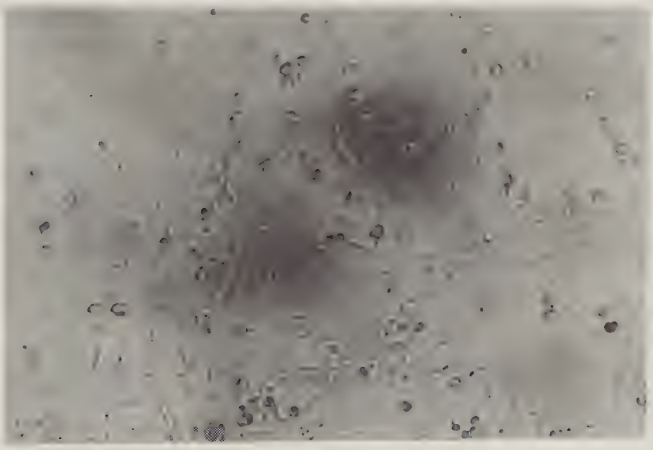


Abb. 9 d : mittleres Klonwachstum,
4o min. nach Gabe von hypotoner Lösung
- s. Abb. 9c: Anzahl der Mitosen deutlich vermehrt -

Abbildungen 10 a - d : großer Klon

Abb. 1o a : großer Klon, in - situ

Abb. 1o b : großer Klon,
4 Std. nach Gabe von Colcemid

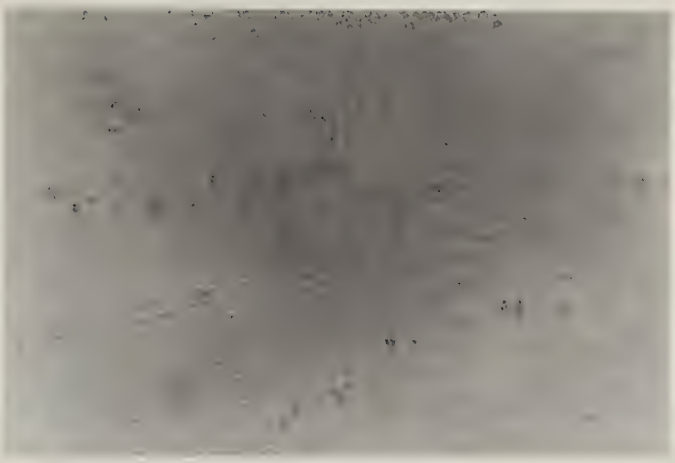


Abb. 1o c : großer Klon,
2o min. nach Gabe von hypotoner Lösung
- deutliche Zunahme der Anzahl der Mitosen -

Abb. 1o d : großer Klon,
4o min. nach Gabe von hypotoner Lösung
- s. Abb. 1oc: Anzahl der Mitosen deutlich vermehrt -

5.2. Auswerbarkeit von Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien

Es sollte geprüft werden, welche morphologischen Kriterien von Mitosen bezüglich der Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse zu verwerten sind.

Es wurden jeweils 3o Mitosen in drei verschiedenen Serien unter modifiziertem Einsatz von Colcemid (s. 4.2.4.1. - 3.) aufgearbeitet.

Eine ausreichend große Zahl an auswertbaren Metaphasen ergab sich nur bei der Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur (s. 5.4.3.). Die Zusammenhänge zwischen der Morphologie und der Auswertbarkeit der Mitosen bei der Chromosomenanalyse wurden deshalb ausschließlich anhand dieser Serie überprüft.

a. Wachstumsstadium des Klons

s. Abb. 8 a : beginnendes Wachstum
s. Abb. 9 a : mittleres Klonwachstum
s. Abb. 1o a : großer Klon

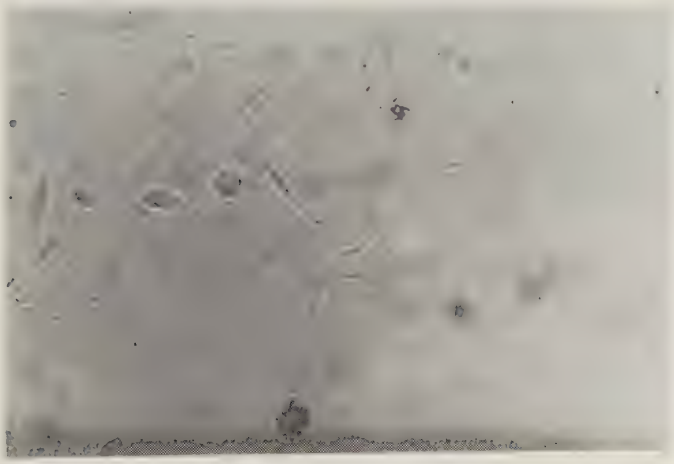
Zur Aufarbeitung wurden 9 Mitosen aus einem kleinen Klon (beginnendes Wachstum), 11 Mitosen aus einem mittelgroßen Klon und 1o Mitosen aus einem großen Klon entnommen.
Die Mitosen aus einem großen Klon waren zu 6o% auswertbar bei einer allgemeinen Auswertbar - keit von 47% aller aufgetropften Mitosen dieser Serie.

b. Lage der Mitose im Klon (Abbildungen 11 und 12)

28 (93%) aller aufgearbeiteten Mitosen lagen im Randbereich der Klone. Dies ist vor allem dadurch zu erklären, daß bei großen Klonen Mitosen fast ausschließlich im Randbereich vorkommen (s. 6.2.b.).

Abb. 11 : zentral gelegene Mitose

Abb. 12 : Mitose im Randbereich eines Klons



c. Größe der Mitose (Abbildungen 13 - 15)

Bei der Aufarbeitung wurde eine willkürliche Einteilung in kleine, mittelgroße und große Mitosen vorgenommen (s. 4.2.2.c.).
Die aufgearbeiteten Mitosen wurden in 2o Fällen als mittelgroß beurteilt, in jeweils 5 Fällen als groß bzw. als klein.
Keines dieser Kriterien hob sich bei der Chromo - somenanalyse in der Auswertbarkeit von der allgemeinen Auswertbarkeit von 47% ab.

Abb. 13 : kleine Mitose

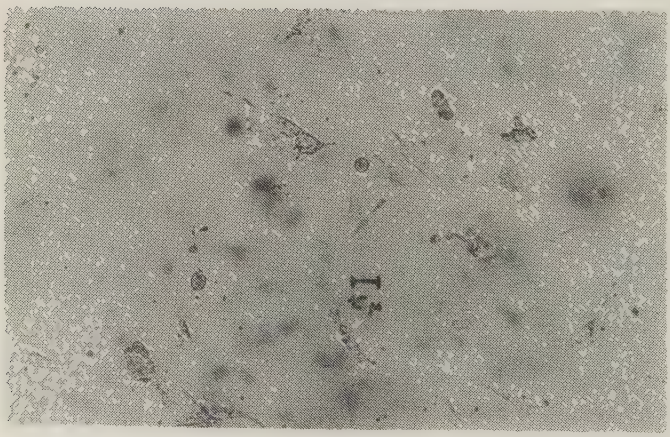


Abb. 14 : mittelgroße Mitose

Abb. 15 : große Mitose

d. Form der Mitose (Abbildungen 16 und 17)

Es wurden annähernd zu gleichen Teilen runde (14) und entrundete Mitosen (16) aufgearbeitet. Jeweils 7 Mitosen waren bei der Chromosomenanalyse auswertbar.

Abb. 16 : runde Mitose

Abb. 17 : entrundete Mitose

e. Randschärfe der Mitose (Abbildungen 18 - 23)

Bei der Durchführung der Versuche wurden 21 Mitosen mit scharfem Rand und 9 Mitosen mit unscharfem Rand aufgearbeitet.
Die Auswertbarkeit dieser beiden Kriterien bei der Chromosomenanalyse zeigte keine nennenswerten Ab - weichungen von der allgemeinen Auswerbarkeit von 47% aller aufgearbeiteten Mitosen.

Die Dokumentation der Randschärfe erfolgte unab - hängig von diesen Untersuchungen durch Aufnahmen der Mitosen in drei verschiedenen Ebenen. Nur die Aufnahme in der Äquatorialebene der Mitose wurde als scharf beurteilt, die beiden anderen Aufnahmen lagen über bzw. unter dieser Ebene und wurden als unscharf beurteilt.

Abb. 18 : unscharfe Mitose
- Aufnahme unter der Äquatorialebene

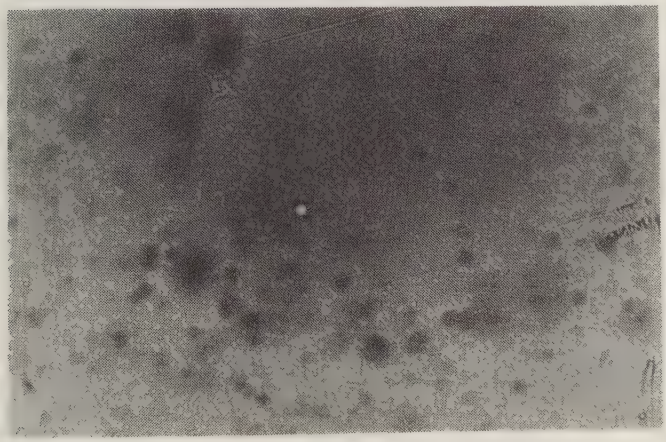


Abb. 19 : dieselbe Mitose;
Aufnahme in der Äquatorialebene:
- scharf -

Abb. 19a : dieselbe Mitose;
Aufnahme über der Äquatorialebene:
- unscharf -

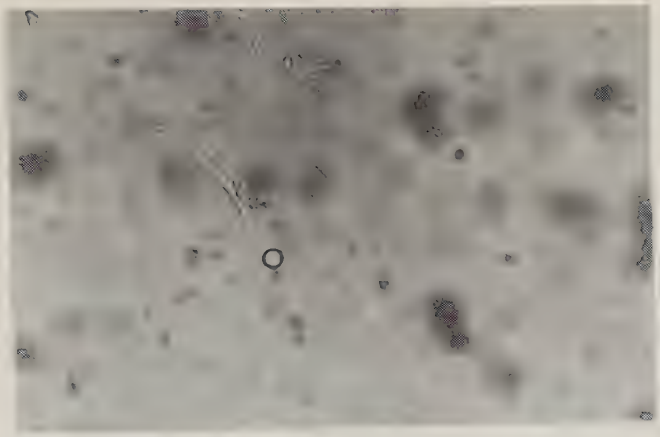


Abb. 21 : unscharfe Mitose:
- Aufnahme unter der Äquatorialebene -

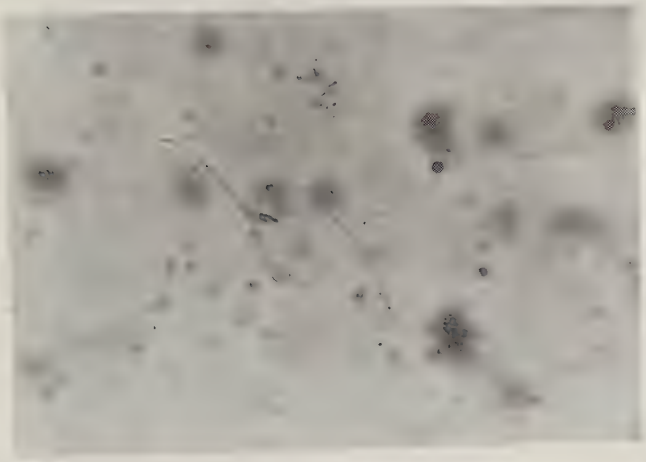


Abb. 22 : dieselbe Mitose;
Aufnahme in der Äquatorialebene:
- scharf -

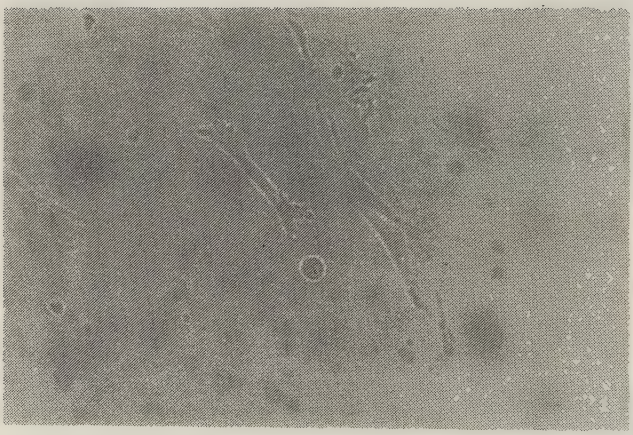


Abb. 23 : dieselbe Mitose;
Aufnahme über der Äquatorialebene:
- unscharf -

f. Ablösbarkeit der Mitose vom Boden
(Abbildungen 24 - 26)

Dieses Kriterium wurde unabhängig von den Unter - suchungen zur Auswertbarkeit der Metaphaseplatten definiert und beurteilt.
Mitosen mit " füßchenartigen " Ausziehungen der Zellmembran ließen sich nur schwer und oft gar nicht vom Boden ablösen, während Mitosen mit glattem Rand meist leicht abzulösen waren.
Eine gezielte Entnahme leicht ablösbarer Mitosen erfolgte unter 4.2.3. (Ergebnisse s. 5.3.).

Abb. 24 : Mitose mit " füßchenartigen " Ausziehungen der Zellmembran; - schwer ablösbar -

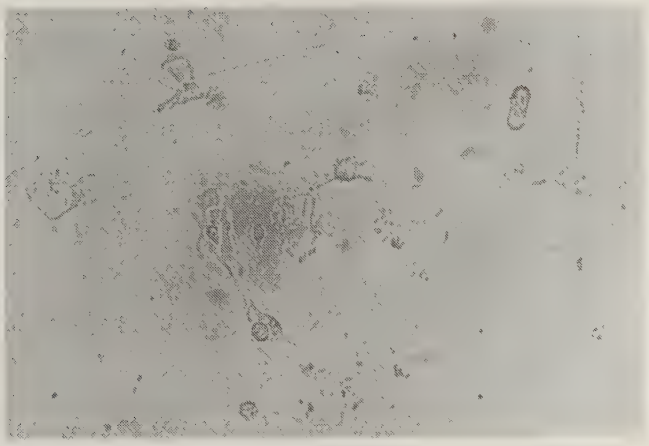


Abb. 25 : Mitose mit " füßchenartigen "
Ausziehungen der Zellmembran;
- schwer ablösbar -

Abb. 26 : Mitose mit glattem Rand;
- leicht ablösbar -

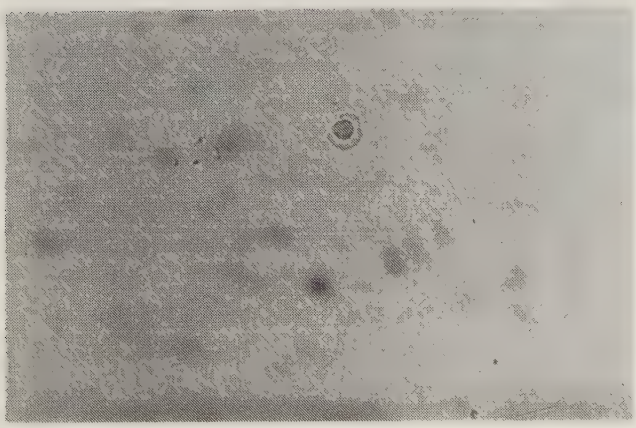
g. Morphologische Veränderungen im hypotonen Schock
(Abbildungen 27 - 31)

Während der ca. 15 Minuten im hypotonen Schock konnten einige morphologische Veränderungen an den Mitosen festgestellt werden:

Verlust der Membranstabilität:	Abb. 27
Größenzunahme:	Abb. 28 und 29
Größenabnahme:	Abb. 3o und 31

Eine Größenzunahme während des hypotonen Schocks konnte bei 18 der 3o aufgearbeiteten Mitosen festgestellt werden, von denen 11 (61%) bei der Chromosomenanalyse auswertbar waren. Dies spricht für einen Zusammenhang zwischen der Größenzunahme einer Mitose im hypotonen Schock und der Auswertbarkeit der aufgetropften Metaphaseplatten.
Die anderen Kriterien zeigten im Gegensatz dazu eine deutliche Verminderung der Auswertbarkeit.

Abb. 27 : Verlust der Membranstabilität
im hypotonen Schock



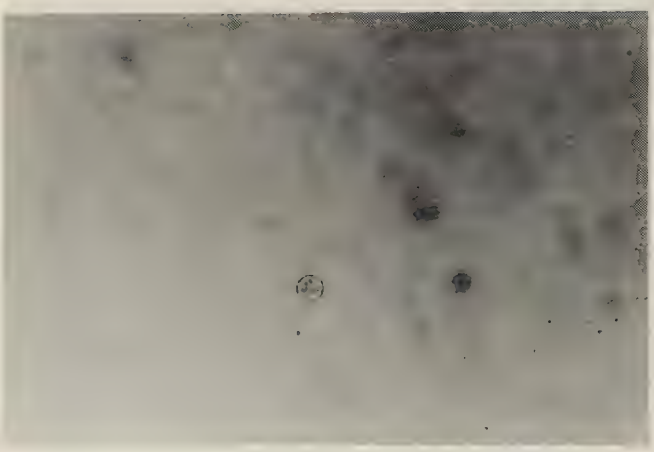


Abb. 28 : Mitose im hypotonen Schock
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

Abb. 29 : dieselbe Mitose; 15 Minuten später
deutliche Größenzunahme durch Quellung
im hypotonen Schock

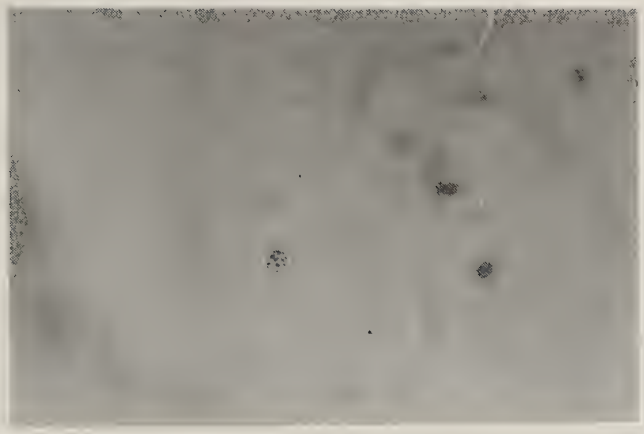


Abb. 3o : Mitose im hypotonen Schock
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

Abb. 31 : dieselbe Mitose; 15 Minuten später:
deutliche Größenabnahme und Verdichtung
der Strukturen innerhalb der Mitose

5.3. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " unter gezielter Entnahme der Mitosen; Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode "

In den vorangegangenen Untersuchungen wurden morphologische Kriterien von Mitosen erstellt und bezüglich der Auswertbarkeit bei der Chromo - somenanalyse überprüft.

Anhand der Erkenntnisse, die in diesen Untersuchungen gewonnen worden waren, wurden nun gezielt diejenigen Mitosen aufgearbeitet, von denen man vermutete, daß sie sich im Stadium der Metaphase befänden. Die Ausbeute an Metaphasen, resp. deren Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse sollte durch dieses Vor - gehen erhöht werden.

Die Ergebnisse nach dieser gezielten Entnahme zeigten, daß sich alle Mitosen bei der Chromosomenanalyse im Stadium der Metaphase befanden. Dies war zu erwarten, da ausschließlich runde (Kugelform = Metaphase, s. 2.2.) und leicht ablösbare Mitosen aufgearbeitet wurden. Außerdem waren die Mitosen durch Gabe von Colcemid zur Kultur (s. 4.2.4.3.) vor der Aufarbeitung in der Metaphase arretiert.
Die Auswertbarkeit der aufgetropften Metaphaseplatten war mit 53% im Vergleich zu allen anderen Unter - suchungen am höchsten.
Die Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " konnte durch ausschließliche Aufarbeitung von Mitosen aus Klonen dokumentiert werden, die bis zu acht Tagen alt waren.

Die Abbildungen 32 - 35 zeigen ein Beispiel für die Aufarbeitung nach gezielter Enznahme der Mitosen.

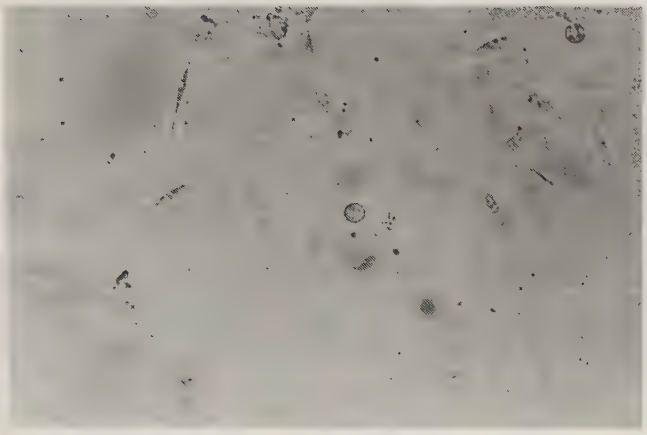


Abb. 32 : runde und leicht ablösbare Mitose
in - situ; vor der Entnahme aus der Kultur

Abb. 33 : dieselbe Mitose im hypotonen Schock;
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

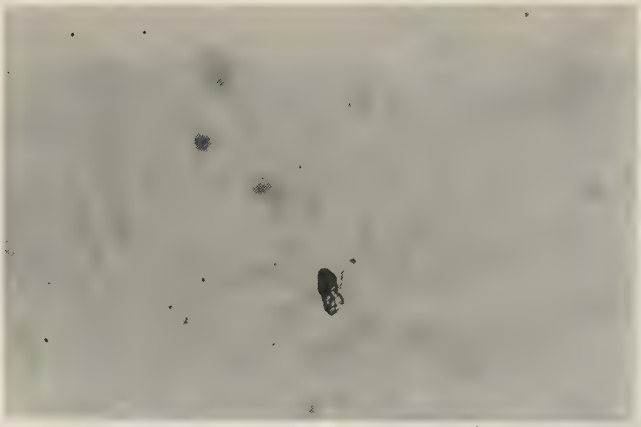


Abb. 34 : dieselbe Mitose; 15 Minuten später:
deutliche Größenzunahme durch Quellung
im hypotonen Schock

Abb. 35 : dieselbe Mitose; nach dem Auftropfen:
auswertbare Metaphase !
männlicher Karyotyp: 46, XY

5.4. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid

Die Notwendigkeit der Verwendung von Colcemid beim Einsatz der " Pipettenmethode " zur Chromosomenpräparation sollte überprüft werden.

Die Ausbeute an Metaphasen bei der Chromosomen - analyse und deren Auswertbarkeit sowie das Vorkommen von frühen (Prophasen) und späten (Anaphasen und Telophasen) Teilungsstadien der Mitosen in Abhängig - keit vom modifizierten Einsatz von Colcemid zeigen die Abbildung 36 und Tabelle 1.

5.4.1. Aufarbeitung ohne Colcemid

Es wurden 3o Mitosen ohne vorherige Arretierung in der Metaphase aufgearbeitet.

Bei der Chromosomenanalyse befanden sich 13 (43%) im Stadium der Metaphase. 2 Metaphasen waren auswertbar. Weitere 1o (33 %) Mitosen befanden sich im Stadium der Anaphase, 4 (13 %) in der Prophase und eine Mitose im Stadium der Telophase. Drei Zellen waren nicht beurteilbar.

Die fehlende Arretierung der Mitosen im Stadium der Metaphase machte sich durch das Vorkommen aller Teilungsstadien bei der Chromosomenanalyse bemerkbar. Die Qualität der aufgetropften Mitosen reichte von " nicht beurteilbar " bis zu " auswertbare Metaphase ".

Die Abbildungen 37 - 44 dokumentieren die Bandbreite in der Qualität der aufgetropften Mitosen nach Aufarbeitung ohne Colcemid.

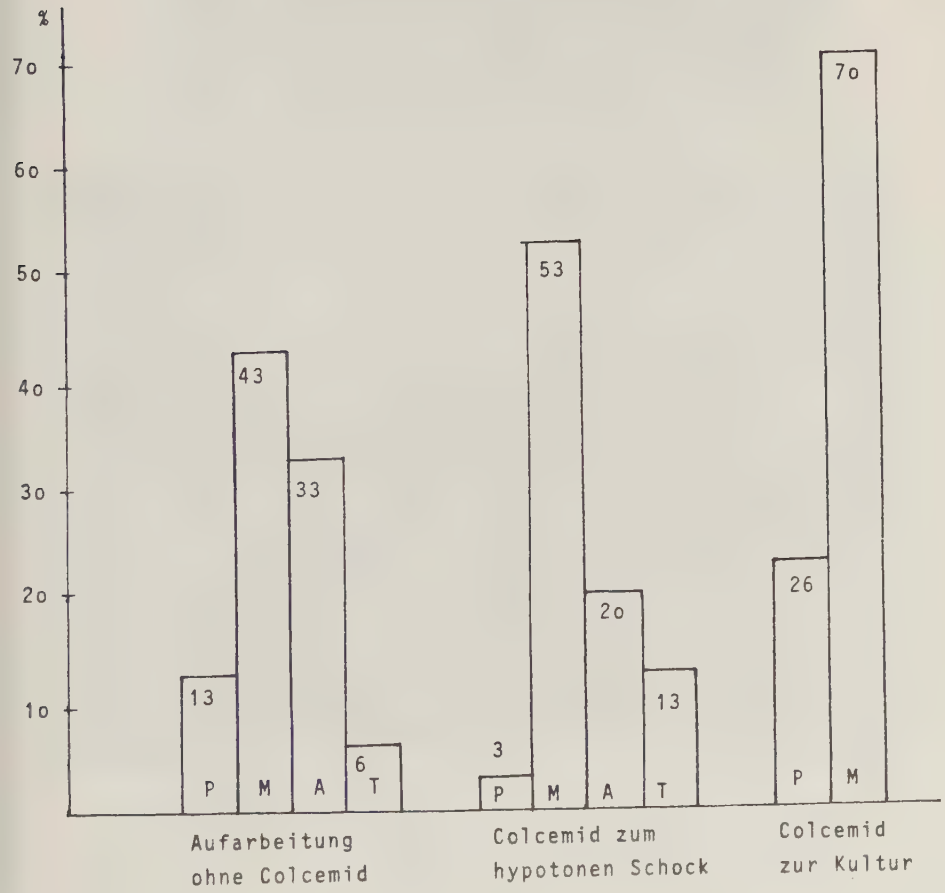
Tabelle 1

	n	Prophasen	Metaphasen	Anaphasen	Telophasen	auswertbar	nicht beurteilbar
1. Aufarbeitung ohne Colcemid	3o	4 (13%)	13 (43%)	1o (33%)	2 (6%)	2 (6%)	1 (3%)
2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock	3o	1 (3%)	16 (53%)	6 (2o%)	4 (13%)	3 (1o%)	3 (1o%)
3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur	3o	8 (26%)	21 (70%)	-	-	14 (47%)	1 (3%)

Abbildung 36 :

Verteilung der Mitosestadien in Abhängigkeit vom modifizierten Einsatz von Colcemid

P : Prophasen
M : Metaphasen
A : Anaphasen
T : Telophasen



Abbildungen 37 - 40 : Aufarbeitung ohne Colcemid
- nicht beurteilbare Mitose -

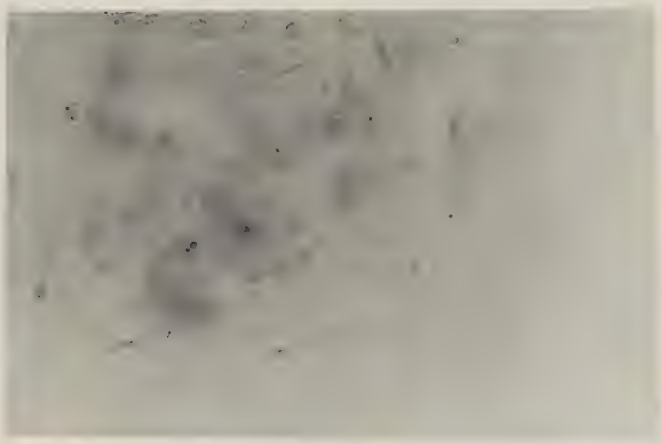


Abb. 37 : Mitose in - situ;
vor der Entnahme aus der Kultur

Abb. 38 : dieselbe Mitose im hypotonen Schock;
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

Abb. 39 : dieselbe Mitose; nach 15 Minuten: Größenzunahme und Verdichtung der Strukturen innerhalb der Mitose

Abb. 4o : dieselbe Mitose; nach dem Auftropfen: nicht beurteilbare Mitose trotz Größenzunahme im hypotonen Schock (vgl. 5.2.g.)

Abbildungen 41 - 44 : Aufarbeitung ohne Colcemid
- auswertbare Metaphase -

Abb. 41 : Mitose in - situ;
vor der Entnahme aus der Kultur

Abb. 42 : dieselbe Mitose im hypotonen Schock;
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

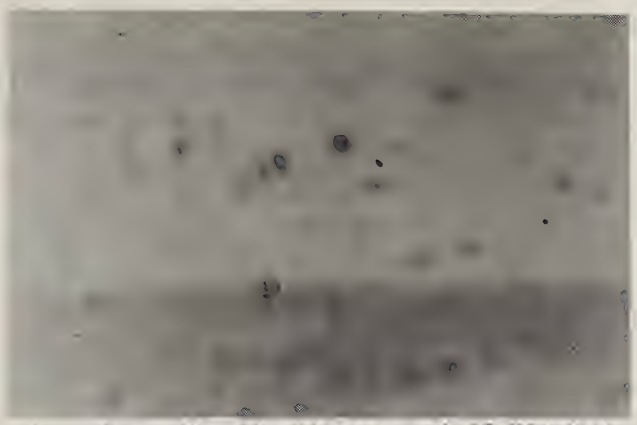


Abb. 43 : dieselbe Mitose; nach 15 Minuten: Größenzunahme im hypotonen Schock

Abb. 44 : dieselbe Mitose; nach dem Auftropfen: auswertbare Metaphase ! männlicher Karyotyp: 46, XY

5.4.2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock

Die wachstumshemmende Wirkung von Colcemid für den Klon sollte verhindert werden. Es sollte dennoch versucht werden, die Mitosen im Stadium der Metaphase zu arretieren. Durch Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock, in welchem die Mitosen nach der Entnahme aus der Kultur für ca. 15 Minuten blieben, sollte dies erreicht werden.

Von den 3o nach diesem Vorgehen aufgearbeiteten Mitosen befanden sich 15 (5o%) bei der Chromosomenanalyse im Stadium der Metaphase.

3 Metaphasen waren auswertbar.

Trotz Colcemid - Einfluß konnte in vielen Fällen eine Weiterentwicklung der Mitosen festgestellt werden.

Die Abbildungen 45 - 52 dokumentieren die Weiterentwicklung der Mitosen trotz Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock.

Abbildungen 45 - 48 : Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock

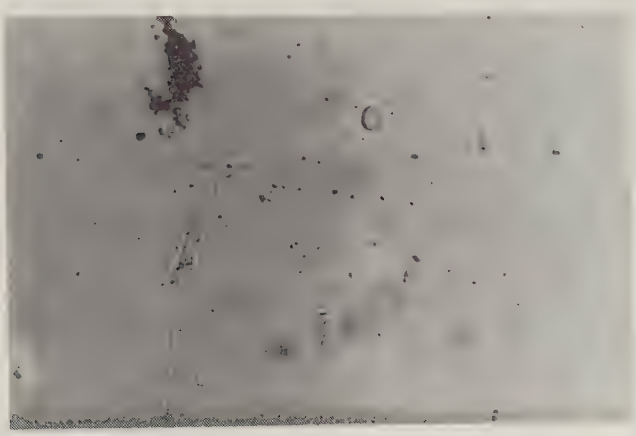


Abb. 45 : Mitose in - situ; vor der Entnahme aus der Kultur

Abb. 46 : dieselbe Mitose im hypotonen Schock; sofort nach der Entnahme aus der Kultur

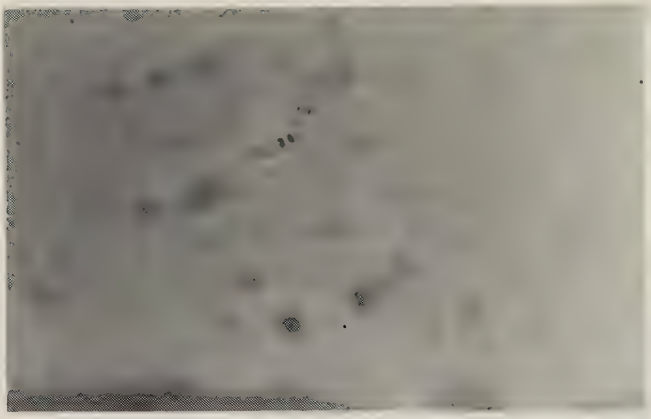


Abb. 47 : dieselbe Mitose; 15 Minuten später:
Weiterentwicklung trotz Colcemid - Einfluß

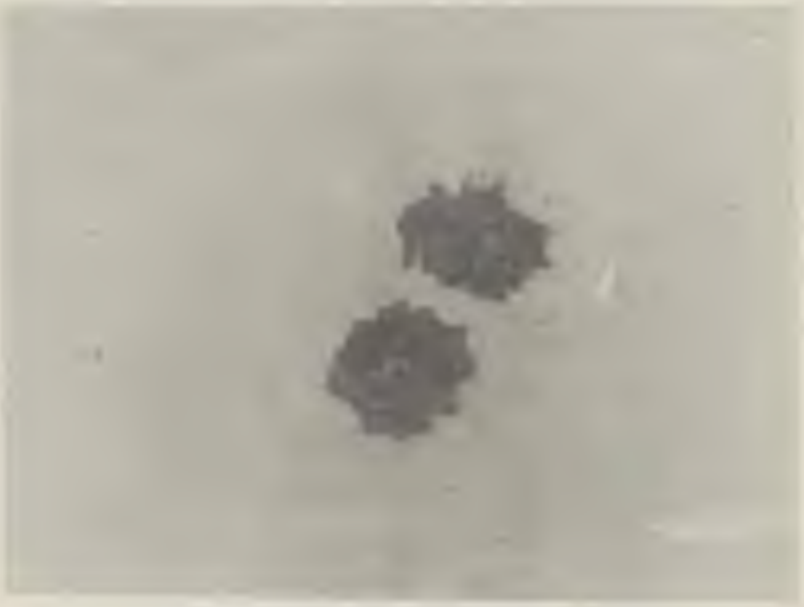


Abb. 48 : dieselbe Mitose; nach dem Auftropfen:
zwei Zellen; Chromosomen nicht beurteilbar

Abbildungen 49 - 52 : Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock

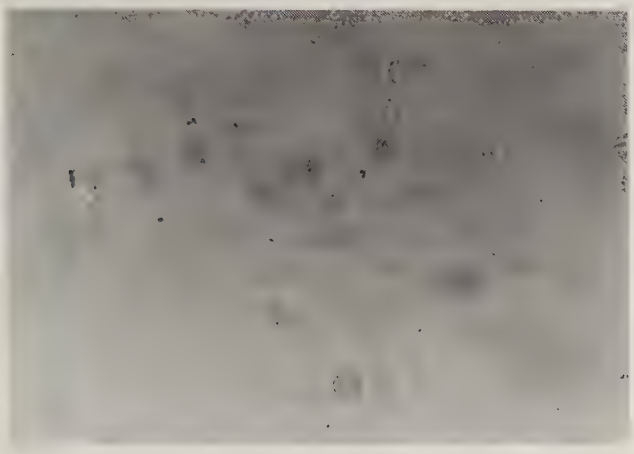


Abb. 49 : Mitose in - situ;
vor der Entnahme aus der Kultur

Abb. 5o : dieselbe Mitose im hypotonen Schock;
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

Abb. 51 : dieselbe Mitose; nach 15 Minuten:
Weiterentwicklung trotz Colcemid - Einfluß

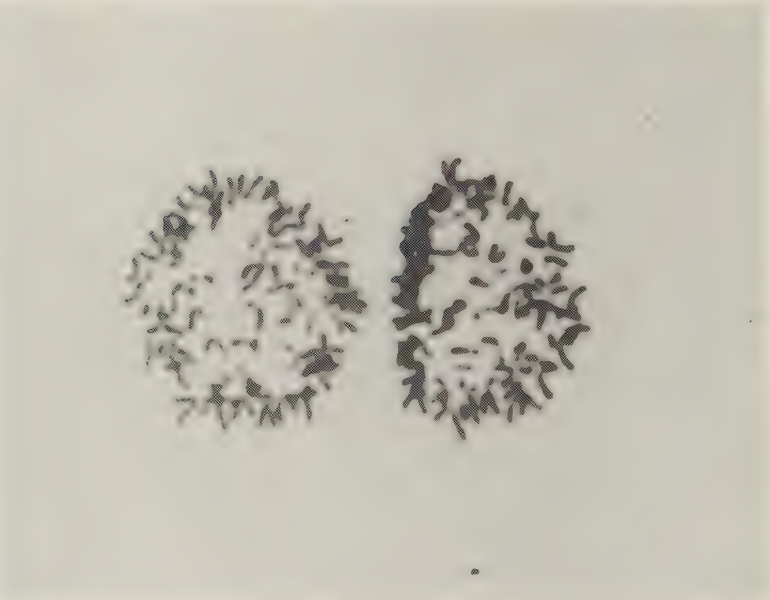


Abb. 52 : dieselbe Mitose; nach dem Auftropfen:
zwei polyploide Zellen;
Chromosomen nicht beurteilbar

5.4.3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur

Die Gabe von Colcemid zur Kultur entspricht dem üblichen Vorgehen bei der Aufarbeitung von Fruchtwasserkulturen (s. 2.1.2. und 2.1.3.).

Durch Aufarbeitung entsprechend diesem Ansatz konnte die Anzahl an Metaphasen bei der Chromosomenanalyse bei 3o aufgearbeiteten Mitosen auf 21 (7o%) erhöht werden.

14 Metaphasen waren auswertbar.

Wie zu erwarten war, hatte sich im hypotonen Schock keine Mitose weiterentwickelt. Bei der Chromosomenanalyse fanden sich daher weder Anaphasen noch Telophasen.

Die Abbildungen 53 - 56 zeigen ein Beispiel einer 14 auswertbaren Metaphasen nach Gabe von Colcemid zur Kultur.

Abbildungen 53 - 56 : Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur

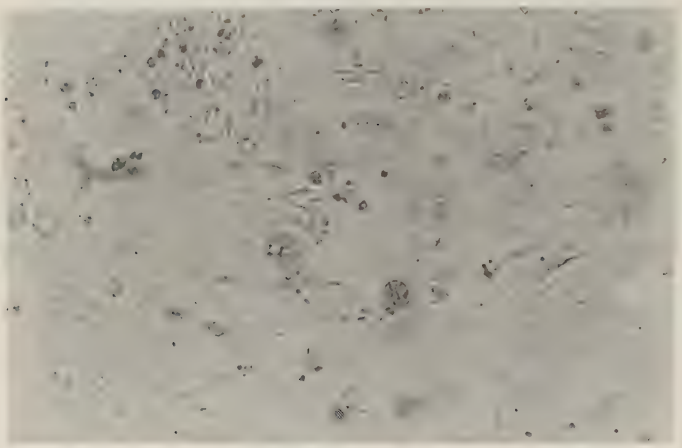


Abb. 53 : Mitose in - situ;
vor der Entnahme aus der Kultur

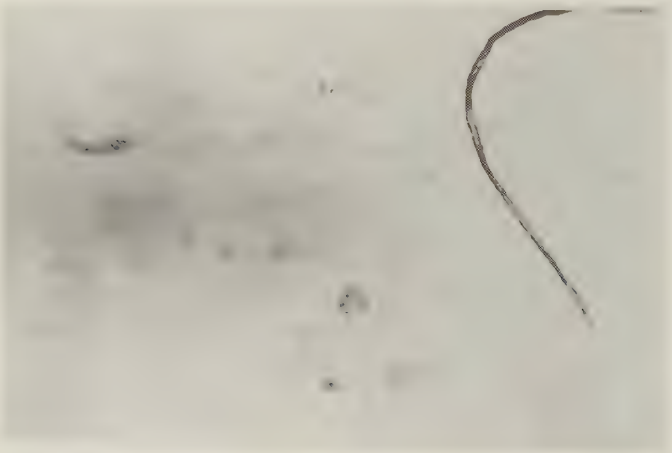


Abb. 54 : dieselbe Mitose im hypotonen Schock;
sofort nach der Entnahme aus der Kultur

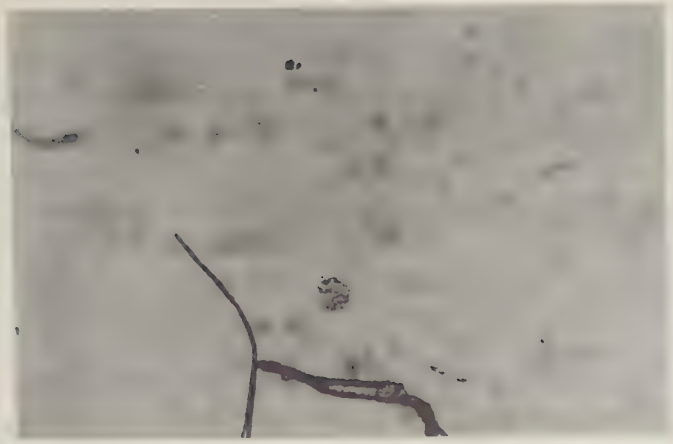


Abb. 55 : dieselbe Mitose; nach 15 Minuten:
Größenzunahme im hypotonen Schock

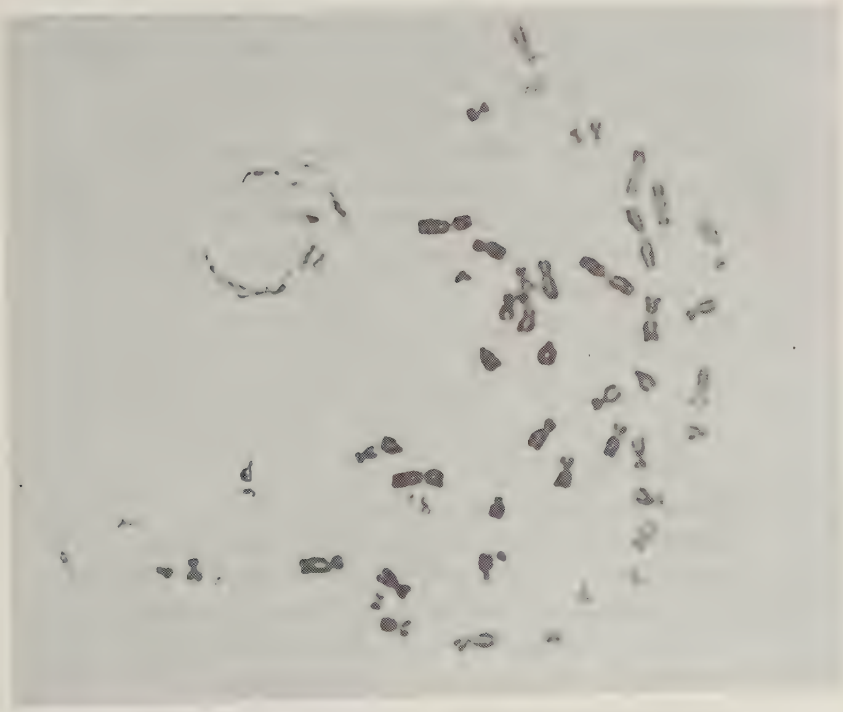


Abb. 56 : dieselbe Mitose; nach dem Auftropfen:
auswertbare Metaphase !
weiblicher Karyotyp: 46, XX

6. D I S K U S S I O N

6.1. Morphologische Veränderungen von Klonen nach Einwirken von Colcemid und hypotoner Lösung

Colchicin, ein Alkaloid aus colchicum autumnale, der Herbstzeitlosen, kann als Prototyp eines Mitosegiftes angesehen werden (WILSON, et al., 1974). KLEINFELD und SISKEN (1966) be - schrieben die größere Wirksamkeit von Colcemid (Demecolcine) als Mitosehemmer bei geringerer Zytotoxizität im Vergleich zu Colchicin.
Die spezifische Wirkung von Colcemid beruht auf der Hemmung der Ausbildung des Spindelapparates während der Zellteilung und ist für eine Vielzahl von Pflanzen - und tierischen Zellen beschrieben worden (EIGISTI und DUSTIN, 1955).
Mikrotubuli sind am Aufbau des Spindelapparates beteiligt und werden durch Colcemid spezifisch inaktiviert (TAYLOR, 1965; BORISY und TAYLOR, 1967, STADLER und FRANKE, 1974). Veränderungen der Zellmorphologie und Beeinflussung von Zell - bewegungen wurden von WILSON et. al (1974) beobachtet und auf die Inaktivierung dieser Mikro - tubuli durch Colcemid zurückgeführt. BERLIN et al. (1974) wiesen Colcemid - empfindliche Strukturen und deren Einfluß auf die Topographie oberfläch - licher Zellelemente nach.

In den eigenen Untersuchungen über den Einfluß von Colcemid auf die Morphologie von Klonen verschiedener Größe wurden Vakuolenbildungen und Schrumpfung von Zellen nach Gabe von Colcemid beobachtet (s. 5.1.). Diese morphologischen Veränderungen bestätigen die bisherigen Erfahrungen über den Einfluß von Colcemid auf wachsende Zellen und lassen sich am ehesten durch dessen zytotoxische Wirkung erklären.
KLEINFELD und SISKEN (1966) sowie SARTORELLY und CREASY (1969) zeigten die partielle Reversibilität der Wirkung von Colcemid bei zeitlich begrenzter Gabe von zwei bis fünf Stunden.

Sie beschrieben die Neubildung des Spindelapparates und die Vollendung der Zellteilung in Colcemid - freiem Medium in den meisten Fällen.

Diese Beobachtungen konnten in den eigenen Unter - suchungen durch die Tatsache bestätigt werden, daß bei zeitlich befristeter Gabe von Colcemid für zwei bis fünf Stunden nach Mediumwechsel ein ungestörtes Wachstum der Kultur zu verzeichnen war.

6.2. Auswertbarkeit der Metaphaseplatten nach Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " in Abhängigkeit von morphologischen Kriterien

a. Wachstumsstadium des Klons

Es wurden Mitosen zu annähernd gleichen Teilen aus den drei Wachstumsstadien des Klons (s. 4.2.2.) aufgearbeitet. Zwar zeigten die Mitosen aus großen Klonen eine gegenüber der Norm erhöhte Auswertbarkeit, insgesamt jedoch scheint das Wachstumsstadium des Klons keinen Einfluß auf die Auswertbarkeit der Metaphase - platten bei der Chromosomenanalyse zu haben.

b. Lage der Mitose im Klon

Die Lage einer Mitose in einem Klon ist abhängig vom Wachstumsstadium des Klons:
bei beginnendem Wachstum mit einzeln liegenden Zellen ohne sichtbaren Kontakt untereinander ist eine Differenzierung in randständige und zentral gelegene Mitosen nicht möglich. Bei mittlerem Klonwachstum (Klongröße entspricht etwa einem Gesichtsfeld im Invertoskop) finden sich die Mitosen meist gleich - mäßig über den gesamten Klon verteilt. Die Zelldichte läßt Teilungsvorgänge in allen Bereichen des Klons zu. In großen Klonen hingegen ist die Wachstumspotenz im Zentrum der Klone durch Kontaktinhibition erloschen, da sich dort ein dichter Zellrasen entwickelt hat. Mitosen finden sich bei großen Klonen deshalb fast ausschließlich in deren Randbereich.

c. Größe der Mitose

Die Größe einer Mitose im Klon scheint keinen Einfluß auf die Auswertbarkeit der Metaphaseplatten bei der

Chromosomenanalyse zu haben. Die Klassifizierung der Mitosen (s. 4.2.2.c.) wurde zwar durch Aus - messung der Mitosen versucht zu objektivieren, bleibt letztlich aber willkürlich.
Zudem wäre die Zahl der durchgeführten Versuche für eine differenzierte Aussage zu gering.
Es fiel auf, daß von fünf als " groß " beurteilten Mitosen vier bei der Chromosomenanalyse einen polyploiden Chromosomensatz aufwiesen. Andererseits war von 2o " mittelgroßen " Mitosen nur eine bei der Chromosomen - analyse polyploid.

d. Form der Mitose

Der Zusammenhang zwischen der Form einer Mitose und ihrem Teilungsstadium wurde erläutert (s. 2.2.). Im Stadium der Metaphase, das für die Auswertbarkeit der Mitosen bei der Chromosomenanalyse entscheidend ist, erscheinen die Mitosen in der mikroskopischen Aufsicht als rund. Die willkürliche Einteilung in runde und ent - rundete Mitosen erwies sich deshalb im Hinblick auf eine Differenzierung bezüglich der Auswertbarkeit der Meta - phaseplatten bei der Chromosomenanalyse als wenig trennscharf. Bei genauerer Oberprüfung dieses Kriteriums wurden letztlich auch fast alle Mitosen als annähernd rund beurteit.

e. Randschärfe der Mitose

Die subjektiv beurteilte Randschärfe einer Mitose hängt zum Teil von der eingestellten Ebene im Invertoskop, d.h. vom Untersucher selbst ab. Andererseits ergibt sich erst aus der Form einer Mitose die Möglichkeit, verschiedene Ebenen bzw. Schärfegrade einzustellen:
entrundete Mitosen, d.h. Mitosen in frühen oder späten Teilungsstadien, lassen sich oft nur in einem kleinen Bereich scharf einstellen, die Zellränder erscheinen dünn und schwarz. Jenseits dieses Bereiches sinkt die Schärfe abrupt ab. Runde Mitosen hingegen, die sich meist im Stadium der Metaphase befinden, lassen sich über einen breiteren Bereich darstellen, in ihrer Äquatorialebene sind sie optimal scharf eingestellt, ihre Zellränder erscheinen dick und schwarz und häufig doppelt konturiert. Die Möglichkeit, eine Mitose als scharf und mit doppelt

konturiertem Rand zu beurteilen, hängt folglich im wesentlichen von der Form resp. dem Teilungsstadium der Mitose ab.

f. Ablösbarkeit der Mitose vom Boden

Zellen lösen sich im Verlauf einer Mitose vom Boden ab und bilden im Stadium der Metaphase eine Kugelform aus. Sie lassen sich dann meist leicht vom Boden ablösen. Mitosen mit " füßchenartigen " Ausziehungen der Zell - membran haften demgegenüber noch fest am Boden. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß sich diese Mitosen noch nicht im Stadium der Metaphase befinden.
Im Hinblick auf die Ausbeute an Metaphasen bei der Chromosomenanalyse resp. deren Auswertbarkeit erscheint es deshalb wichtig, gezielt leicht ablösbare Mitosen aus einem Klon zu entnehmen.

g. Morphologische Veränderungen der Mitosen im hypotonen Schock

Der hypotone Schock bewirkte eine Reihe von Veränderungen an den Mitosen, was sich an deren Größenzunahme, der Größenabnahme oder dem Verlust der Membranstabilität bemekbar machte. (Zur Weiterentwicklung der Mitosen im hypotonen Schock s. 6.4.2.)
Nur bei Größenzunahme (Quellung im hypotonen Medium) während des hypotonen Schocks wurden bei der Chromosomen - analyse ausreichend gespreitete und auswertbare Metaphasen beobachtet. Größenabnahme oder Verlust der Membranstabili - tät führten in allen Fällen zu nicht auswertbaren Metaphasen.
Die Bedeutung der Größenzunahme einer Mitose im hypotonen Schock kann zwar nur retrospektiv anhand der aufgetropften Metaphaseplatten beurteilt werden, scheint aber im Hinblick auf die Auswertbarkeit der Metaphasen bei der Chromosomenanalyse ein wichtiges Kriterium zu sein.

6.3. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " unter gezielter Entnahme der Mitosen; Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode "

Die Ergebnisse aus 5.2. zeigen, daß zur Erhöhung der Auswertbarkeit der Metaphasen bei der Chromosomenanalyse vor allem die Entnahme runder und leicht ablösbarer Mitosen erforderlich ist. Weiterhin scheint die vorherige Gabe von Colcemid zur Kultur notwendig zu sein, um tatsächlich alle Mitosen im Stadium der Metaphase zu arretieren (s. 5.4.3.).
Die Ergebnisse nach dieser gezielten Entnahme der Mitosen (s. 5.3.) bestätigen, daß es für den effektiven Ein - satz der " Pipettenmethode " zur Chromosomenpräparation letztlich auf diese genannten Voraussetzungen ankommt.

Zur Dokumentation der Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " wurden lediglich Mitosen aus Klonen zur Aufarbeitung herangezogen, die bis zu acht Tagen alt waren. Dies verdeutlicht, daß der Einsatz der " Pipettenmethode " nicht - wie die beiden bisher gebräuchlichen Methoden der Chromosomenpräparation - an ein ausreichend langes Wachstum der Kultur gebunden ist. Die Aufarbeitung kann theoretisch beginnen, sobald die ersten Mitosen in der Kultur erscheinen.

6.4. Aufarbeitung mit der " Pipettenmethode " nach modifiziertem Einsatz von Colcemid

6.4.1. Aufarbeitung ohne Colcemid

Die möglichen Vorteile einer Aufarbeitung ohne Colcemid wurden erläutert (s. 3.).
Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, bei der auf eine Arretierung der Mitosen im Stadium der Metaphase verzichtet wurde, zeigten bei der Chromosomenanalyse Mitosen in allen Teilungs - stadien. Diese Tatsache ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß die Mitosen ohne Berück - sichtigung ihrer Morphologie entnommen wurden, von der im wesentlichen das Teilungsstadium abhängt (s. 2.2.).

Das Vorkommen aller Teilungsstadien und die geringe Auswertbarkeit bei der Chromosomen - analyse verdeutlichen, daß auch beim Einsatz der " Pipettenmethode " zur Chromosomenpräparation nicht auf die Arretierung der Mitosen im Stadium der Metaphase verzichtet werden kann.

6.4.2. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock

Die Ausbeute an Metaphasen und ihre Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse konnten geringfügig erhöht werden. Dies ist wahrscheinlich auf den Zuwachs an Erfahrung bei der Identifizierung der der Mitosen vor der Entnahme zurückzuführen.
Es wurde jedoch in vielen Fällen eine Weiterent - wicklung der Mitosen im hypotonen Schock trotz Colcemid - Einfluß beobachtet.
Die einzig mögliche Erklärung dieser Tatsache ist die Entnahme der Mitosen zu einem Zeitpunkt, an dem sie nicht mehr durch Colcemid gehemmt werden konnten. WANG et al. (1975) wiesen nach, daß Colcemid seine spezifische Wirkung bereits in der G_1 - Phase des Zellzyklus entfaltet, jedoch keinen Einfluß auf die DNA - Synthese in der S - Phase mehr hat.
Bei der Entnahme aus dem Klon waren die Mitosen folglich in aller Regel nicht mehr sensibel für Colcemid, der Spindelapparat hatte sich in der frühen Prophase bereits gebildet, und die Zell - teilung lief trotz Colcemid - Zusatz im hypotonen Schock ungestört weiter.
Die Tatsache, daß sich bei der Chromosomenanalyse dennoch ein Teil der Mitosen im Stadium der Metaphase befand, ist durch die Entnahme in einem so frühen Stadium der Mitose zu erklären, in der der Spindelapparat noch nicht ausgebildet war; die Entnahme der Mitosen war nämlich auch bei dieser Versuchsreihe weitgehend ohne Berücksichtigung der Morphologie der Mitosen erfolgt.

6.4.3. Aufarbeitung nach Gabe von Colcemid zur Kultur

Die Erkenntnisse über die Spezifität der Wirkung von Colcemid (s. 6.4.2.) verdeutlichen, daß nur bei Gabe von Colcemid zur Kultur vor Beginn der Aufarbeitung die Zellen in der Colcemid - sensiblen Phase erreicht und im Stadium der Metaphase arretiert werden können. Die Ergebnisse dieses Vesuchsansatzes zeigen, daß dieses Vorgehen auch beim Einsatz der " Pipetten - methode " zur Chromosomenpräparation die wichtigste Voraussetzung zur Erzielung einer ausreichend hohen Ausbeute an Metaphasen bei der Chromosomenanalyse ist.

6.5. Kritische Bewertung der " Pipettenmethode "

Die " Pipettenmethode " dient der Chromosomendiagnostik klonal gewachsener Zellen aus dem Fruchtwasser. Durch gezielte Entnahme einzelner Mitosen ist sie im Gegen - satz zu den bisher gebräuchlichen Methoden der Chromosomenpräparation weitgehend unabhängig vom Wachstumsalter der Kultur. Dies bedeutet in der Regel eine wesentliche Verkürzung der Zeitspanne zwischen dem Ansatz der Kultur und der Chromosomendiagnostik.

Die Anwendung der " Pipettenmethode " erfordert eine Einarbeitungszeit zur sachgerechten Bedienung des Mikronanipulators und stellt Anforderungen an die Geschicklichkeit des Untersuchers. Die weiteren technischen Voraussetzungen (Herstellung und Silikon - isierung ausgezogener Pasteur - Pipetten, Bereitstellung von hypotoner Lösung und frisch angesetztem Fixativ, Gabe von Colcemid zur Kultur zwei bis fünf Stunden vor Beginn der Aufarbeitung) sind jedoch so wenig aufwendig, daß der Entschluß zur Aufarbeitung jederzeit getroffen werden kann.
Wichtiger als die Beherrschung der Aufarbeitungstechnik ist das Erkennen derjenigen Mitosen in einer Kultur, die bei der Chromosomenanalyse auswertbare Metaphasen liefern. Dazu ist die Kenntnis der Zusammenhänge zwischen der Morphologie der Mitosen und ihrem Teilungs - stadium erforderlich.
Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, daß auch bei Optimierung der technischen und methodischen Voraus - setzungen die Auswertbarkeit der aufgetropften Metaphaseplatten nicht wesentlich über 5o% liegt (s. 5.3.). Andererseits läßt sich belegen, daß die zunehmende Erfahrung in der Erkennung der " richtigen " Mitosen ein wesentlicher Faktor zur Erhöhung der Ausbeute an Metaphasen resp. deren Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse ist (s. 5.4. 1 - 3).
Eine weitere, bisher ungelöste Schwierigkeit der " Pipettenmethode " besteht in der Tatsache, daß es oft nötig ist, das Präparat systematisch nach den aufgetropften Metaphaseplatten abzusuchen. Dies ist

meist mit größerem zeitlichen Aufwand verbunden. In vielen Fällen konnte die Suche dadurch abgekürzt werden, daß zunächst der Bereich im Zentrum der aufgetropften Flüssigkeitsmenge abgesucht wurde.

Die routinemäßige Anwendung der " Pipettenmethode " in der Pränataldiagnostik setzt die Möglichkeit voraus, die bekannten banding - Techniken in vergleichbarer Qualität zu den bisher gebräuchlichen Methoden der Chromosomenpräparation einzusetzen.

Untersuchungen zur Adaptation dieser banding - Techniken an die " Pipettenmethode " sind in Arbeit.

7. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit enthält Untersuchungen zur Standardisierung der " Pipettenmethode ", einer neuen, zeitsparenden Methode zur Chromosomenpräparation.

Diese Untersuchungen wurden an Kulturen fetaler Amnionzellen vorgenommen, die nach den üblichen Labormethoden angelegt worden waren.

Zunächst wurden die morphologischen Veränderungen von Klonen verschiedener Wachstumsstadien (beginnendes Wachstum, mittelgroßer Klon, großer Klon) nach Gabe von Colcemid und hypotoner Lösung überprüft und beschrieben. Nach Gabe von Colcemid zu den Klonen waren viele Zellen geschrumpft, die Zellränder scharf konturiert, und teilweise bildeten sich Vakuolen in den Zellen. Die Gabe von hypotoner Lösung verursachte in vielen Fällen eine Größenzunahme der Zellen durch Quellung, die Randkonturen der Zellen wirkten verschwommener.

In einer weiteren Untersuchung wurden morphologische Kriterien von Mitosen definiert und im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse überprüft. Dabei zeigte sich, daß runde und leicht ablösbare Mitosen am ehesten dem Stadium der Metaphase zuzuordnen sind, einer wesentlichen Voraussetzung für die Auswerbarkeit bei der Chromosomenanalyse.

Anschließend erfolgte deshalb eine gezielte Entnahme runder und leicht ablösbarer Mitosen. Die Ausbeute an Metaphasen resp. deren Auswertbarkeit bei der Chromosomenanalyse sollte durch dieses Vorgehen erhöht werden. Bei der Chromosomenanalyse befanden sich alle Mitosen im Stadium der Metaphase. Die Auswertbarkeit der aufgetropften Metaphaseplatten war mit 53% im Vergleich zu allen anderen ausgeführten Untersuchungen am höchsten.

Die Zeitersparnis beim Einsatz der " Pipettenmethode " wurde durch ausschließliche Entnahme von Mitosen aus denjenigen Klonen dokumentiert, die bis zu acht Tagen alt waren.

Die Notwendigkeit der Verwendung von Colcemid zur Arretierung der Mitosen in der Metaphase beim Einsatz der " Pipettenmethode " wurde in einer letzten Versuchsreihe überprüft. Dabei wurde in der ersten Serie auf die Verwendung von Colcemid bei der Auf - arbeitung verzichtet. In der zweiten Serie erfolgte die Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock, um einer - seits die Mitosen in der Metaphase zu arretieren und andererseits die wachstumshemmende Wirkung von Colcemid für die Kultur zu vermeiden. In der dritten Serie erfolgte die Gabe von Colcemid zur Kultur, wie es dem üblichen Vorgehen bei der Aufarbeitung von Fruchtwasser - kulturen entspricht (s. 2.1.2. und 2.1.3.). Der Verzicht auf die Verwendung von Colcemid bei der Aufarbeitung ergab bei der Chromosomenanalyse Mitosen in allen Teilungs - stadien, die Ausbeute an Metaphasen betrug 43%, und nur eine Metaphase war auswertbar. Die Gabe von Colcemid zum hypotonen Schock konnte die Weiterentwicklung der Mitosen nicht verhindern. Es befanden sich zwar 53% der auf - gearbeiteten Mitosen bei der Chromosomenanalyse im Stadium der Metaphase, die Auswertbarkeit der aufge - tropften Metaphaseplatten betrug jedoch lediglich 1o%. Bei Gabe von Colcemid zur Kultur betrug die Ausbeute an Metaphasen bei der Chromosomenanalyse 7o%, und es wurden keine späteren Teilungsstadien vorgefunden. Die Auswert - barkeit der aufgetropften Metaphaseplatten betrug 47%.

Beim Einsatz der " Pipettenmethode " zur Chromosomen - präparation kann auf die vorherige Arretierung der Mitosen durch Gabe von Colcemid zur Kultur nicht verzichtet werden.

Die Anwendung der " G - banding " Technik ist inzwischen erfolgreich durchgeführt worden.

Der routinemäßige Einsatz der " Pipettenmethode " zur pränatalen Diagnostik genetisch bedingter Defekte verspricht eine wesentliche Zeitersparnis im Vergleich zu den bisher gebräuchlichen Methoden der Chromosomenpräparation.

8. L I T E R A T U R

BERLIN, et al.: Control of cell surface topography
Nature, 247: 45 - 46 (1974)

BORISY, G., TAYLOR, E.W.:
The mechanism of interaction of colchicine
I. Binding of colchicine - ^{3}H to cellular proteins
J. Cell Biol., 34: 525 ff. (1967)

CLAUSSEN, U.: The Pipette Method:
a new rapid technique for chromosome analysis in prenatal diagnosis
Human Genetics, 54: 277 - 278 (1980)

EIGISTI, O.J., DUSTIN, P.Jr.:
Colchicine - in agriculture, medicine, biology and chemistry
Ames. Iowa State College Press (1955)

GUNTER, G.R., WANG, J.L., EDELMAN, G.M.:
Kinetics of colchicine inhibition of mitogenesis in individual lymphocytes
Exp. Cell Res., 98: 15 - 22 (1976)

HOEHN, et al.: Cultivated cells of diagnostic amniocentesis in second trimester pregnanacies
I. Clonal morphology and growth potential
Ped. Res., 8: 756 - 754 (1974)

HOEHN, et al.: Cultivated cells of diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies
II. Cytogenetic parameters as functions of clonal types and preparative technique
Clin. Genetics, 7: 29 - 36 (1975)

JACOBSON, C.B., BARTER, R.H.:

Intrauterine diagnosis and management of genetic defects
Am. J. Obst., 15: 796 - 807 (1967)

KLEINFELD, R.G., SISKEN, J.E.:

Morphological and kinetic aspects of mitotic arrest by and recovery from colcemid
J. Cell Biol., 31: 369 - 379 (1969)

KNÖRR - GÄRTNER, H., HÄRLE, J.:

A modified method of culturing human amniotic fluid cells for prenatal detection of genetic disorders
Humangenetik, 14: 333 - 334 (1972)

NADLER, H.L.: Antenatal detection of genetic disorders
Pediatrics, 42: 912 - 917 (1968)

SARTORELLY, A.C., CREASY, W.A.:

Cancer chemotherapy
Annual Review of Pharmacology, 9: 51 - 72
(1969)

SCHMID, W.: A technique for in - situ karyotyping of primary amniotic fluid cell cultures
Humangenetik, 30: 325 - 330 (1975)

SCHMID, W.: Cytogenetical problems in prenatal diagnosis
Hereditas, 86: 37 - 44 (1977)

STADLER, FRANKE:

Colchicine binding proteins in chromatin and membranes
J. Cell Biol., 60: 297 (1974)

STEELE, M.W., BREG, W.R.:

Chromosome analysis of human amniotic fluid cells
Lancet, 1: 383 - 385 (1966)

TAYLOR, E.W.: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis
I. Kinetics of inhibition and the binding of ^3H - colchicine
J. Cell Biol., 25: 145 - 160 (1965)

THERKELSEN, A.J.:

Cell culture and cytogenetic techniques in prenatal diagnosis
J.D. Murken, S. Stengel - Rutkowski, E. Schwinger (eds.), : 258 - 275
Stuttgart: Ferdinand Enke Publishers (1979)

VALENTI, C., KEHATY, T., SCHUTTA, E,J.:

Culture of cells obtained by amniocentesis
J. Lab. and Clin. Med., 73: 355 - 358
(1969)

WANG, J.L., GUNTER, G.R., EDELMAN, G.M.:

Inhibition by colchicine of the mitotic stimulation of lymphocytes prior to the S - phase
J. Cell Biol., 66: 128 - 144 (1975)

WILSON, et al.:

Interaction of drugs with microtubule proteins
Fed. Proceedings, 33: 158 (1974)

Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. Uwe C l a u s s e n
danke ich für seine wertvolle Unterstützung und für
die Oberlassung des Themas.

LEBENSLAUF

Am 29. Juni 1957 wurde ich als zweiter Sohn des Dipl. - Kfm. Wolfgang Hermann und seiner Ehefrau Erika, geb. Schwitte, in Hilden / Rhld. geboren.

Ostern 1964 wurde ich in die Adolf Reichwein - Volksschule, Hilden, Beethovenstraße, eingeschult.

Nach vier Grundschuljahren (zwei Kurzschuljahre) wechselte ich im Sommer 1967 zum Städtischen Helmholtz - Gymnasium Hilden. Hier legte ich im Sommer 1976 die Reifeprüfung ab.

Zum Wintersemester 1976/77 begann ich das Medizin - studium an der Universität Düsseldorf und bestand hier im Sommer 1978 die ärztliche Vorprüfung.

Im Frühjahr 1979 begann ich im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf mit den Untersuchungen zur Standardisierung der " Pipettenmethode ".